



· 论 著 ·

# 多西他赛联合胸腺肽 $\alpha 1$ 对大鼠乳腺癌免疫微环境中Treg数量的影响及其机制研究

曹爱玲, 曹 喆, 周 剑

咸宁市中心医院 / 湖北省科技学院第一临床医学院肿瘤科, 湖北 咸宁 437000

**[摘要]** 背景与目的: 乳腺癌患者体内存在严重的免疫失衡, 胸腺肽 $\alpha 1$  (thymosin  $\alpha 1$ , T $\alpha 1$ ) 作为免疫增强剂发挥作用, 探究多西他赛 (docetaxel, DCT) 联合T $\alpha 1$ 对大鼠乳腺癌免疫微环境中调节性T细胞 (regulatory T cell, Treg) 数量的影响, 并初步分析其作用机制。方法: 随机将60只雌性SD大鼠分为模型组、DCT组 (剂量为10 mg/kg)、T $\alpha 1$ 组 (剂量为0.8 mg/kg) 及3个DCT+T $\alpha 1$ 组 (DCT剂量为10 mg/kg, T $\alpha 1$ 剂量分别为0.2、0.4、0.8 mg/kg), 每组10只。给雌性SD大鼠接种大鼠乳腺癌细胞系SHZ-88建立移植瘤模型, 成瘤后, DCT组、T $\alpha 1$ 组及DCT+T $\alpha 1$ 组分别腹腔注射相应剂量的DCT、T $\alpha 1$ , 给药周期均为20 d, 1次/d。测量大鼠肿瘤体积, 采用原位末端转移酶标记 (TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 染色法检测肿瘤细胞的凋亡情况。采用流式细胞术检测大鼠肿瘤组织中CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg数量及表达程序性死亡 [蛋白] -1 (programmed death-1, PD-1) 的Treg数量, 采用酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测肿瘤组织中白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10)、转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 的表达, 采用蛋白质印迹法 (Western blot) 检测肿瘤组织中PD-1及程序性死亡 [蛋白] 配体-1 (programmed death ligand-1, PD-L1) 的表达。结果: 与模型组相比, 给药组均可明显抑制肿瘤的生长, 促进肿瘤细胞凋亡, 显著下调CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg数量, 以及IL-10、TGF- $\beta$ 、PD-1和PD-L1的表达 ( $P < 0.05$ ), 其中DCT+0.8 mg/kg T $\alpha 1$ 组作用效果最显著, 明显优于其他给药组。结论: DCT联合T $\alpha 1$ 可抑制大鼠肿瘤的生长, 其中以DCT+0.8 mg/kg T $\alpha 1$ 效果最显著, 作用机制可能是通过下调PD-1/PD-L1的表达, 抑制CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg浸润。

**[关键词]** 多西他赛; 胸腺肽 $\alpha 1$ ; 乳腺癌; 免疫; 调节性T细胞

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2021.09.005

中图分类号: R737.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2021)09-0799-08

**Effects of docetaxel combined with thymosin  $\alpha 1$  on number of Treg in immune microenvironment of rats with breast cancer and its mechanism** CAO Ailing, CAO Zhe, ZHOU Jian (Department of Oncology, Xianning Central Hospital/First Clinical Medical College of Hubei University of Science and Technology, Xianning 437000, Hubei Province, China)

Correspondence to: CAO Ailing E-mail: p258ksw@163.com

**[Abstract]** **Background and purpose:** There is severe immune imbalance in breast cancer patients. Thymosin  $\alpha 1$  (T $\alpha 1$ ) acts as an immune enhancer. The aim of this study was to explore the effects of docetaxel (DCT) combined with T $\alpha 1$  on number of regulatory T cell (Treg) in immune microenvironment of rats with breast cancer, and preliminarily analyze its action mechanism. **Methods:** Sixty female SD rats were randomly divided into model group, DCT group (10 mg/kg), T $\alpha 1$  group (0.8 mg/kg) and three DCT+T $\alpha 1$  (10 mg/kg DCT; 0.2, 0.4, 0.8 mg/kg T $\alpha 1$ ) groups with 10 cases in each group. SD female rats were inoculated with breast cancer cell line SHZ-88 to construct xenograft models. After tumor formation, DCT group, T $\alpha 1$  group and DCT+T $\alpha 1$  group were given intraperitoneal injection of DCT and T $\alpha 1$  respectively. The administration period was 20 d, once a day. The tumor volume was measured. TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) staining was applied to detect apoptosis of tumor cells. The number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg, expression of programmed death-1 (PD-1) and number of Treg in tumor tissues were detected by flow cytometry. The expressions of interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) in tumor tissues were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expressions of PD-1 and programmed death ligand-1 (PD-L1) in tumor tissues were detected by Western blot. **Results:** Compared with model group, drug administration effectively inhibited tumor growth,

基金项目: 湖北省教育厅重点基金项目 (D20152812)。

通信作者: 曹爱玲 E-mail: p258ksw@163.com

promoted apoptosis of tumor cells and significantly down-regulated the number of  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  Treg and expressions of IL-10, TGF- $\beta$ , PD-1 and PD-L1 ( $P < 0.05$ ). The action effect in DCT+0.8 mg/kg T $\alpha$ 1 group was the most significant, which was significantly better compared with the other administration groups. **Conclusion:** DCT combined with T $\alpha$ 1 can inhibit growth of rat tumor. The effect of DCT+0.8 mg/kg T $\alpha$ 1 is the most significant, and its mechanism may involve down-regulating expression of PD-1/PD-L1 and inhibiting infiltration of  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  Treg.

[**Key words**] Docetaxel; Thymosin  $\alpha$ 1; Breast cancer; Immunity; Regulatory T cell

乳腺癌是常见的女性恶性肿瘤之一, 目前, 中国乳腺癌的发病率逐年上升, 且发病年龄呈现年轻化趋势, 严重威胁女性的生命健康<sup>[1]</sup>。乳腺癌常规的治疗手段包括手术、放疗、化疗及内分泌治疗等。随着治疗手段的进步和女性健康意识的增强, 乳腺癌的死亡率基本保持平稳<sup>[2]</sup>, 但乳腺癌类型中的三阴性乳腺癌仍是临床治疗的难题, 其预后较差, 转移复发的风险较高, 无法有效控制病情<sup>[3]</sup>。因此, 寻求一种新型、有效、安全的治疗方法对乳腺癌患者有重要的临床意义。近年来, 肿瘤的免疫治疗成为研究热点。临床研究<sup>[4-5]</sup>显示, 多种恶性肿瘤(如乳腺癌、胃癌等)患者体内存在免疫失衡, 表现为免疫负性因子调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)数量异常升高, 提示Treg在肿瘤免疫中有重要作用, 可能促进肿瘤进展, 并抑制肿瘤特异性免疫。多西他赛(docetaxel, DCT)是第二代紫杉烷类化疗药物, 对于乳腺癌治疗的临床效果较好<sup>[6]</sup>。胸腺肽 $\alpha 1$ (thymosin  $\alpha 1$ , T $\alpha$ 1)是一种免疫增强剂, 可诱导T细胞的发育和成熟, 增强患者的免疫功能<sup>[7]</sup>。宋晓丹等<sup>[8]</sup>研究显示, 将免疫调节剂乌司他丁与DCT联用, 可通过调节肿瘤微环境中Treg数量, 抑制小鼠乳腺癌的生长。但DCT联合T $\alpha$ 1用于乳腺癌的报道较少, 本研究旨在探究DCT联合T $\alpha$ 1对大鼠乳腺癌免疫微环境Treg数量的影响及其相关机制, 为乳腺癌的临床用药提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞株和动物

SHZ-88大鼠乳腺癌细胞株购自美国ScienCell公司。无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级SD大鼠由中国科学院上海实验动物中心提供[动物许可证号: SCXK(沪)2019-

0010], 6~8周龄, 雌性, 体重180~220 g, 常规饲养1周, 使其适应环境。

### 1.2 试剂和仪器

DCT注射液购自江苏恒瑞医药股份有限公司(国药准字H20080366, 规格: 1.5 mL : 60 mg), 胸腺肽肠溶片购自吉林康乃尔药业有限公司(国药准字H20065576, 规格: 15 mg  $\times$  12片), 原位末端转移酶标记(TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)试剂盒购自瑞士Roche公司(批号11772465001), 流式细胞术用试剂购自美国Beckman Coulter公司, 白介素10(interleukin 10, IL-10, 批号KE1435)、转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ , 批号KE1443)酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自美国Immonoway公司, 程序性死亡受体-1(programmed death receptor-1, PD-1, 批号为018L3521)兔单克隆抗体、程序性死亡受体-1配体(programmed death ligand 1, PD-L1, 批号为018L3018)兔单克隆抗体购自美国Abcam公司。

### 1.3 分组、造模与干预

将60只SD大鼠随机分为模型组、DCT组(剂量为10 mg/kg)、T $\alpha$ 1组(剂量为0.8 mg/kg)及3个DCT+T $\alpha$ 1组(DCT剂量为10 mg/kg, T $\alpha$ 1剂量分别为0.2、0.4、0.8 mg/kg), 每组10只。以含有10%胎牛血清的RPMI-1640培养基培养SHZ-88细胞, 收集生长状态良好的SHZ-88细胞, 待细胞密集成片时加入胰蛋白酶进行传代培养, 取对数生长期细胞制成 $2 \times 10^7$ 个细胞/mL的细胞悬液, 于大鼠第4对乳腺处皮下注射50  $\mu$ L SHZ-88细胞悬液, 构建乳腺癌大鼠模型<sup>[9]</sup>, 对照组以等量0.9%NaCl溶液替代。观察并记录大鼠一般情况和肿瘤生长情况, 10 d左右可在注射部位触及肿块, 经H-E染色判断是否为肿瘤细胞。成瘤后, DCT组、T $\alpha$ 1组及DCT+T $\alpha$ 1组分别腹腔注射相应

剂量的DCT、T $\alpha$ 1, 给药周期均为20 d, 1次/d; 对照组和模型组以0.9%NaCl溶液替代。

#### 1.4 样本采集与处理

干预结束后, 采用颈椎脱臼法处死大鼠, 剥离肿瘤组织, 冻存于液氮罐中备用。肿瘤生长抑制率=(模型组肿瘤体积-治疗组肿瘤体积)/模型组肿瘤体积 $\times$ 100%。

##### 1.4.1 TUNEL染色

将肿瘤组织固定于4%甲醛溶液中过夜, 石蜡包埋后切片, 参照TUNEL试剂盒说明书进行操作, 在光镜下观察肿瘤细胞的凋亡情况并计数, 细胞凋亡率=凋亡细胞数/总细胞数 $\times$ 100%。

##### 1.4.2 流式细胞术检测

提取肿瘤组织中的淋巴细胞, 分管作抗体标记, 加入染色缓冲液洗涤细胞后再加入固定剂和穿膜剂, 避光条件下温育30 min; 加入穿膜缓冲液洗涤后, 重悬于染色缓冲液中, 采用流式细胞术进行检测, 以CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>细胞/CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>细胞反映Treg数量。

##### 1.4.3 ELISA检测

将肿瘤组织冰上匀浆, 以10 000 r/min离心10 min, 分离上清液, 参照ELISA试剂盒说明书进行操作, 检测肿瘤组织中IL-10、TGF- $\beta$ 的表达。

##### 1.4.4 蛋白质印迹法(Western blot)检测

提取肿瘤组织中的总蛋白, 取60  $\mu$ g变性

蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE);  $\beta$ -actin、PD-1、PD-L1一抗以1:1 000比例稀释, 4  $^{\circ}$ C下反应过夜; 第2天, HRP标记二抗以1:8 000比例稀释, 37  $^{\circ}$ C下反应40 min; 最后进行电化学发光(electrochemical luminescence, ECL)成像, 以 $\beta$ -actin为内参, 计算PD-1及PD-L1的相对表达量。

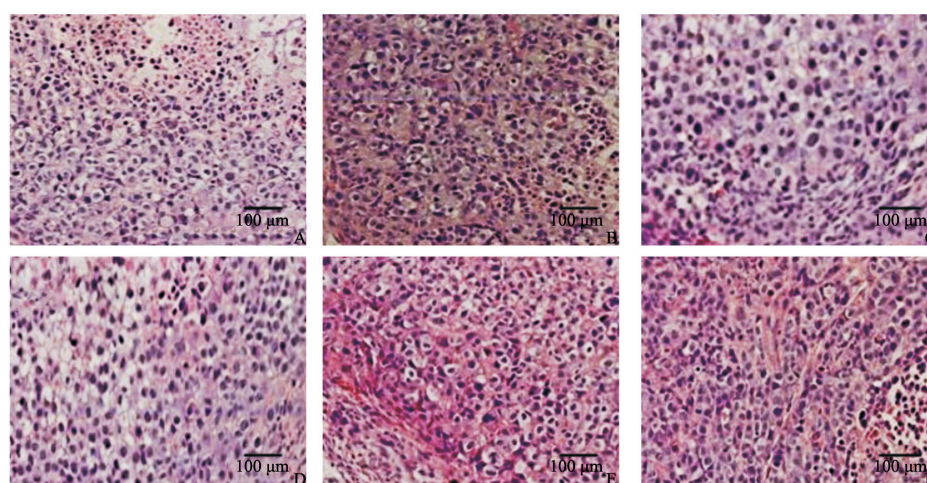
#### 1.5 统计学处理

采取SPSS 20.0统计学软件进行数据分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 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 $q$ 检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 DCT联合T $\alpha$ 1对乳腺癌大鼠肿瘤组织形态学的影响

H-E染色显示, 所取肿块组织中有椭圆形或圆形癌细胞, 大小不一, 染色质、核仁着色深, 可见病理性核分裂象, 细胞排列紊乱, 呈弥漫性片状实性分布(图1), 表明该组织为癌变组织, 乳腺癌大鼠模型复制成功。与模型组相比, 其他给药组细胞增大, 肿瘤细胞开始坏死, 且伴随有淋巴细胞和白细胞浸润, 以DCT+0.8 mg/kg T $\alpha$ 1组肿瘤细胞抑制效果最显著。



(H-E staining,  $\times$ 400)

图1 DCT联合T $\alpha$ 1对乳腺癌大鼠肿瘤组织形态学的影响

Fig. 1 Effects of DCT combined with T $\alpha$ 1 on morphology of tumor tissues in breast cancer rats

A: Model group; B: DCT group; C: 0.8 mg/kg T $\alpha$ 1 group; D: DCT+0.2 mg/kg T $\alpha$ 1 group; E: DCT+0.4 mg/kg T $\alpha$ 1 group; F: DCT+0.8 mg/kg T $\alpha$ 1 group

2.2 DCT联合 $T\alpha 1$ 对乳腺癌大鼠肿瘤生长的影响

药物干预组均可显著抑制肿瘤的生长, DCT+0.8 mg/kg  $T\alpha 1$ 组抑制效果最显著, 显著高于DCT组和0.8 mg/kg  $T\alpha 1$ 组 ( $P < 0.05$ , 图2、3)。TUNEL染色结果见图4, 各组肿瘤细胞凋亡率的差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 与模型组相比, 药物处理组均可显著促进肿瘤细胞凋亡 ( $P < 0.05$ ), 其中DCT+0.8 mg/kg  $T\alpha 1$ 组细胞凋亡率显著高于DCT组和0.8 mg/kg  $T\alpha 1$ 组 ( $P < 0.05$ )。

2.3 DCT联合 $T\alpha 1$ 对肿瘤组织中Treg数量的影响

流式细胞术检测结果显示, 各组肿瘤组织中 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  Treg数量差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 与模型组相比, 药物干预组均可显著下调 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  Treg数量 ( $P < 0.05$ ), 其中DCT+0.8 mg/kg  $T\alpha 1$ 组下调作

用最显著, 显著低于DCT组和0.8 mg/kg  $T\alpha 1$ 组 ( $P < 0.05$ , 图5)。

2.4 DCT联合 $T\alpha 1$ 对肿瘤组织中IL-10、TGF- $\beta$ 水平的影响

与模型组相比, 药物处理组均可显著下调IL-10、TGF- $\beta$ 水平 ( $P < 0.05$ ), 其中DCT+0.8 mg/kg  $T\alpha 1$ 组IL-10、TGF- $\beta$ 水平显著低于DCT组和0.8 mg/kg  $T\alpha 1$ 组 ( $P < 0.05$ , 图6)。

2.5 DCT联合 $T\alpha 1$ 对肿瘤组织中PD-1、PD-L1表达的影响

各组大鼠肿瘤组织中PD-1、PD-L1表达的差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 与模型组相比, 药物干预组均可显著下调PD-1、PD-L1表达 ( $P < 0.05$ ), 其中DCT+0.8 mg/kg  $T\alpha 1$ 组下调作用最显著 (图7、8)。

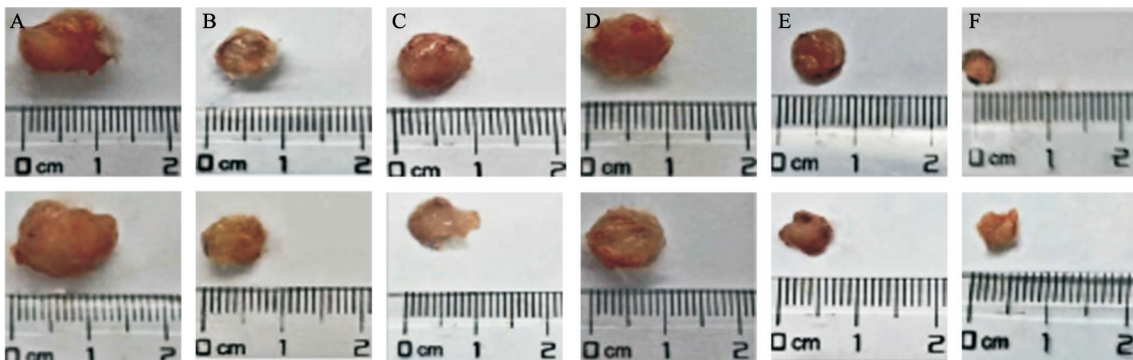


图2 各组乳腺癌大鼠剥离肿瘤组织

Fig. 2 The stripped tumor tissues of breast cancer rats in each group

A: Model group; B: DCT group; C: 0.8 mg/kg  $T\alpha 1$  group; D: DCT+0.2 mg/kg  $T\alpha 1$  group; E: DCT+0.4 mg/kg  $T\alpha 1$  group; F: DCT+0.8 mg/kg  $T\alpha 1$  group

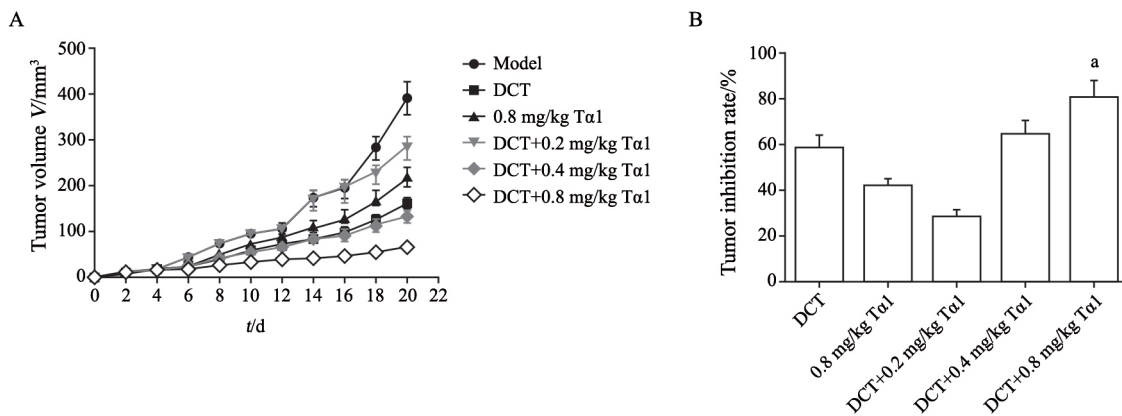


图3 DCT联合 $T\alpha 1$ 对乳腺癌大鼠肿瘤体积的影响

Fig. 3 Effects of DCT combined with  $T\alpha 1$  on tumor volume of breast cancer rats

A: Tumor volume of each group; B: Tumor inhibition rate of each group. a:  $P < 0.05$ , compared with DCT group and 0.8 mg/kg  $T\alpha 1$  group

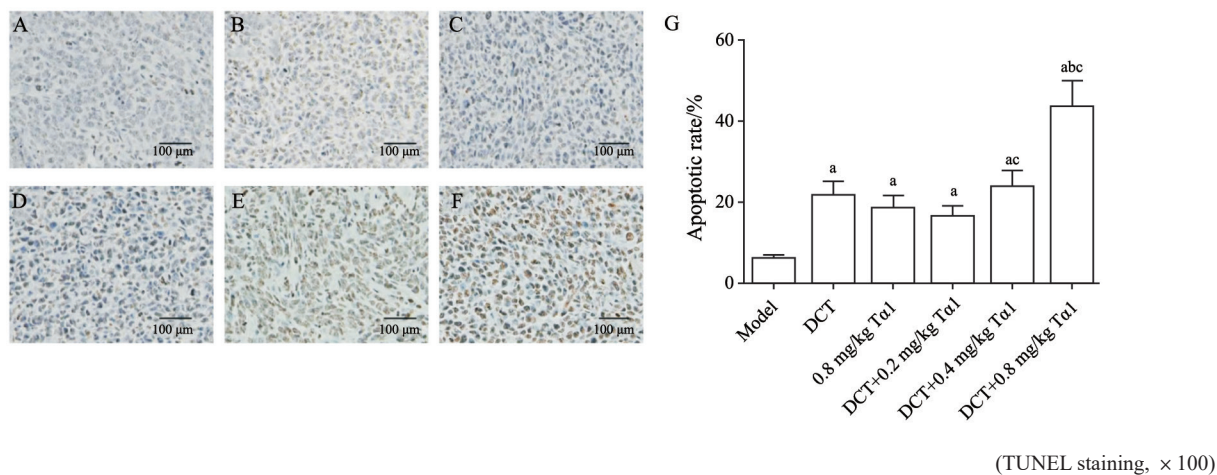


图 4 DCT联合Tα1对乳腺癌大鼠肿瘤细胞凋亡的影响

Fig. 4 Effects of DCT combined with Tα1 on tumor cells apoptosis in breast cancer rats

A: Model group; B: DCT group; C: 0.8 mg/kg Tα1 group; D: DCT+0.2 mg/kg Tα1 group; E: DCT+0.4 mg/kg Tα1 group; F: DCT+0.8 mg/kg Tα1 group; G: Apoptotic rate of each group. a:  $P < 0.05$ , compared with model group; b:  $P < 0.05$ , compared with DCT group; c:  $P < 0.05$ , compared with 0.8 mg/kg Tα1 group

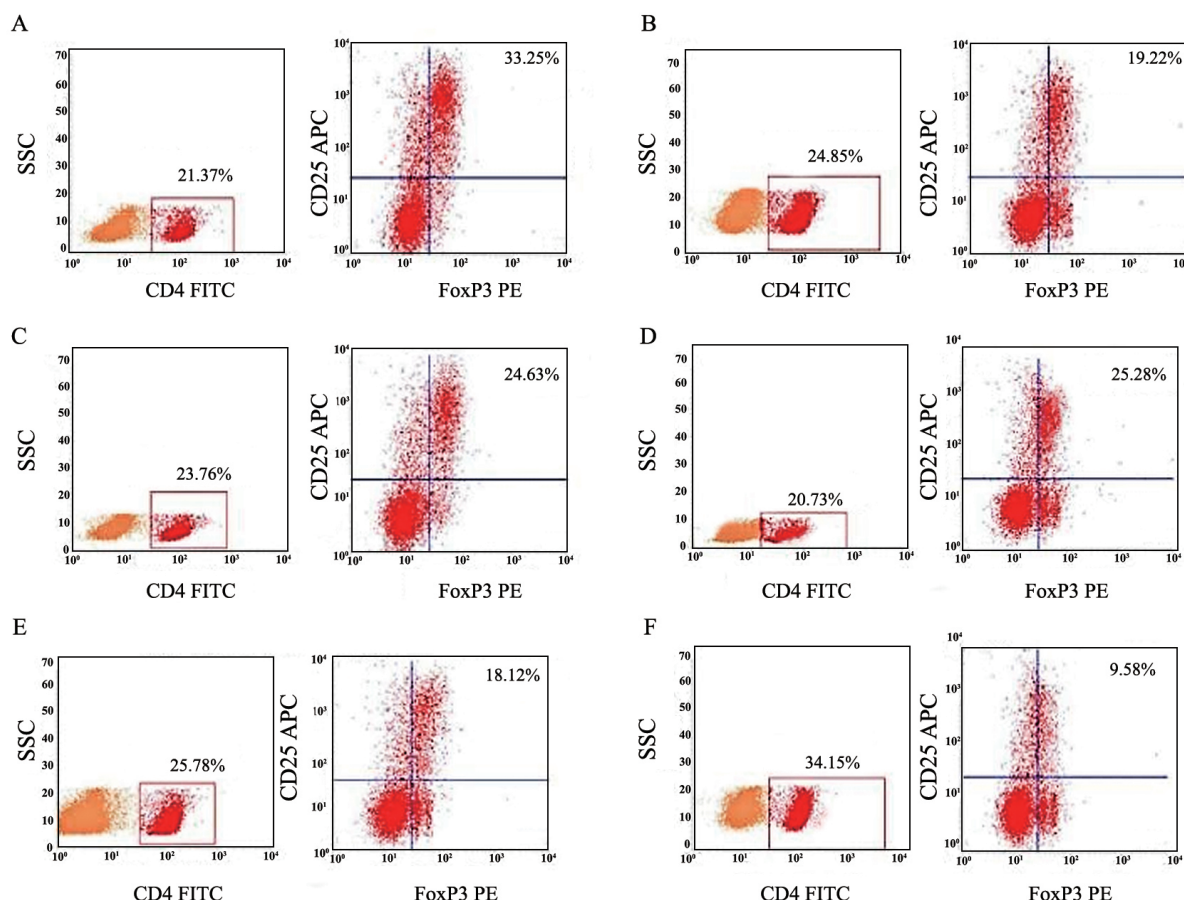


图 5 DCT联合Tα1对肿瘤组织中Treg数量的影响

Fig. 5 Effects of DCT combined with Tα1 on number of Treg in tumor tissues

A: Model group; B: DCT group; C: 0.8 mg/kg Tα1 group; D: DCT+0.2 mg/kg Tα1 group; E: DCT+0.4 mg/kg Tα1 group; F: DCT+0.8 mg/kg Tα1 group

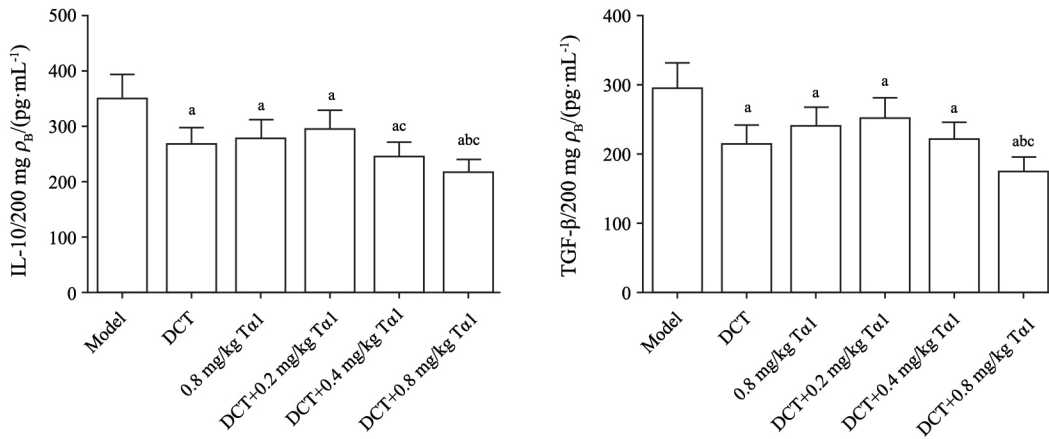


图 6 DCT联合T $\alpha 1$ 对肿瘤组织中IL-10和TGF- $\beta$ 水平的影响

Fig. 6 Effects of DCT combined with Ta1 on levels of IL-10 and TGF- $\beta$  in tumor tissues

a:  $P < 0.05$ , compared with model group; b:  $P < 0.05$ , compared with DCT group; c:  $P < 0.05$ , compared with 0.8 mg/kg Ta1 group

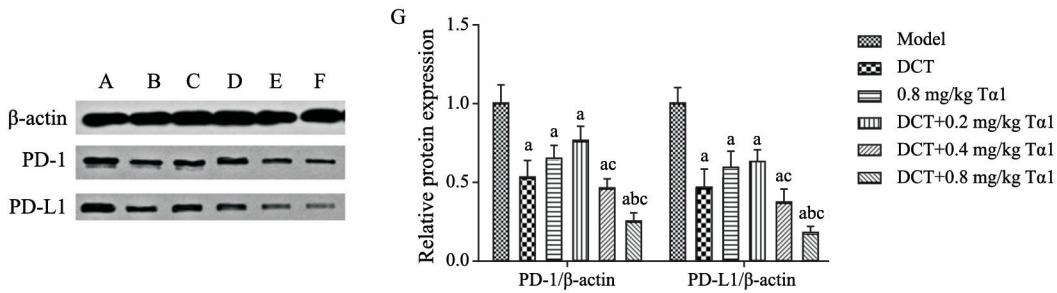


图 7 DCT联合T $\alpha 1$ 对肿瘤组织中PD-1和PD-L1表达的影响

Fig. 7 Effects of DCT combined with Ta1 on the expressions of PD-1 and PD-L1 in tumor tissues

A: Model group; B: DCT group; C: 0.8 mg/kg Ta1 group; D: DCT+0.2 mg/kg Ta1 group; E: DCT+0.4 mg/kg Ta1 group; F: DCT+0.8 mg/kg Ta1 group; G: Relative protein expression of each group. a:  $P < 0.05$ , compared with model group; b:  $P < 0.05$ , compared with DCT group; c:  $P < 0.05$ , compared with 0.8 mg/kg Ta1 group

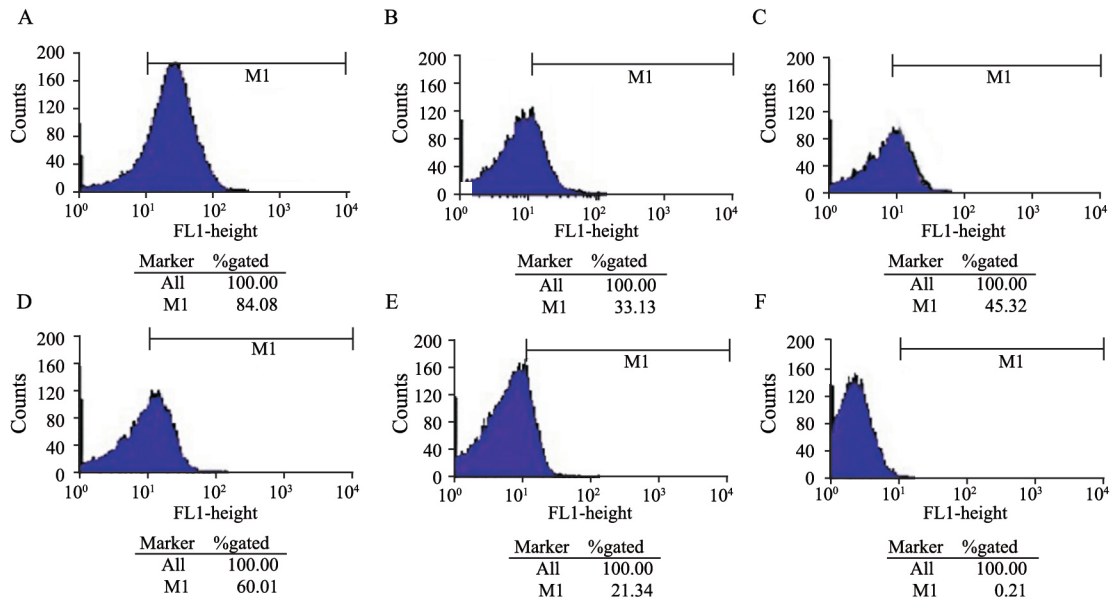


图 8 各组表达PD-1的Treg数量的比较

Fig. 8 Comparison of the number of Treg with PD-1 expression among all groups

A: Model group; B: DCT group; C: 0.8 mg/kg Ta1 group; D: DCT+0.2 mg/kg Ta1 group; E: DCT+0.4 mg/kg Ta1 group; F: DCT+0.8 mg/kg Ta1 group

### 3 讨 论

本研究通过给雌性SD大鼠接种大鼠乳腺癌细胞系SHZ-88,建立移植瘤模型,10 d左右注射部位可触及肿块组织,H-E染色结果显示为癌组织,提示乳腺癌大鼠模型复制成功。 $T\alpha 1$ 可通过调节炎症反应水平对机体免疫功能产生影响,临床已应用于癌症、感染、免疫缺陷等疾病的治疗。Vladimirova等<sup>[10]</sup>研究显示,应用 $T\alpha 1$ 辅助治疗晚期乳腺癌患者的效果较好,可抑制肿瘤血管的生成。Guo等<sup>[11]</sup>研究指出, $T\alpha 1$ 可通过PTEN介导PI3K/AKT/mTOR通路抑制乳腺癌细胞增殖,并诱导其凋亡。本研究发现, $T\alpha 1$ 组可控制大鼠肿瘤组织体积,抑制其生长,同时促进肿瘤细胞的凋亡,与Wang等<sup>[12]</sup>的研究结果相似,提示 $T\alpha 1$ 可能通过解除免疫抑制状态,增加对肿瘤细胞的免疫力。而DCT联合 $T\alpha 1$ 对肿瘤的抑制效果更好,提示联用 $T\alpha 1$ 可增强DCT的抗肿瘤效果, $T\alpha 1$ 可以改善免疫功能,增强对肿瘤的抑制作用。

肿瘤微环境内多种因素参与调控肿瘤与免疫系统的相互作用,如局部效应细胞的功能障碍、Treg和T细胞代谢活性的负调节等。最近研究<sup>[13]</sup>指出,肿瘤微环境的免疫抑制可能削弱免疫治疗的效果。因此,正确调节肿瘤微环境的免疫抑制状态可能成为肿瘤治疗的新方向。Treg是一类负性免疫调控作用的T细胞,可激活TGF- $\beta$ 、IL-10等细胞因子的释放,活化和募集更多的Treg,抑制抗肿瘤的效应T细胞<sup>[14]</sup>。大量数据表明,TGF- $\beta$ 、IL-10可以通过增强肿瘤细胞运动功能并抑制免疫功能等促进肿瘤的侵袭和转移,参与肿瘤的逃逸和转移过程<sup>[15-16]</sup>。本研究结果显示,DCT联合 $T\alpha 1$ 后,CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Treg数量、IL-10及TGF- $\beta$ 水平显著下降,提示DCT联合 $T\alpha 1$ 可能通过降低Treg浸润,减少TGF- $\beta$ 、IL-10的分泌,增强机体对肿瘤细胞的免疫能力。

近年来有研究<sup>[17]</sup>指出,PD-1/PD-L1信号通路可介导负性免疫调节通路,促进肿瘤免疫逃逸。PD-1分布于Treg表面,是Treg发挥免疫抑制作用的重要分子;而PD-L1可诱导Treg发育和

成熟,与TGF- $\beta$ 有协同作用<sup>[18]</sup>。本研究结果显示,DCT联合 $T\alpha 1$ 可显著下调肿瘤组织中PD-1、PD-L1表达,提示DCT联合 $T\alpha 1$ 可能通过抑制PD-1/PD-L1信号通路,降低Treg浸润,从而减轻肿瘤免疫抑制状态,抑制肿瘤的生长。

综上所述,本研究报道了DCT联合 $T\alpha 1$ 对乳腺癌大鼠肿瘤组织的抑制作用,其中DCT+0.8 mg/kg  $T\alpha 1$ 效果最佳,初步分析其调控机制可能是通过抑制PD-1/PD-L1信号通路调节肿瘤免疫微环境,不仅为临床DCT和 $T\alpha 1$ 的联合应用提供了全新的理论依据,同时也为乳腺癌带来新的治疗思路。

### [参 考 文 献]

- [1] 刘 赛,陈少芬,李文林,等.乳腺癌微环境成纤维细胞对乳腺癌细胞表达TIGAR和Bcl-2的影响[J].中国免疫学杂志,2018,34(2):177-182.  
LIU S, CHEN S F, LI W L, et al. Effect of fibroblasts in breast cancer microenvironment on expression of TIGAR and Bcl-2 of breast cancer cells [J]. Chin J Immunol, 2018, 34(2): 177-182.
- [2] JESELSOHN R, DE ANGELIS C, BROWN M, et al. The evolving role of the estrogen receptor mutations in endocrine therapy-resistant breast cancer [J]. Curr Oncol Rep, 2017, 19(5): 35.
- [3] SU S S, TIAN Y H, LI Y Y, et al. "Triple-punch" strategy for triple negative breast cancer therapy with minimized drug dosage and improved antitumor efficacy [J]. ACS Nano, 2015, 9(2): 1367-1378.
- [4] TAYLOR N A, VICK S C, IGLESIA M D, et al. Treg depletion potentiates checkpoint inhibition in claudin-low breast cancer [J]. J Clin Invest, 2017, 127(9): 3472-3483.
- [5] KINDLUND B, SJÖLING Å, YAKKALA C, et al. CD4+ regulatory T cells in gastric cancer mucosa are proliferating and express high levels of IL-10 but little TGF- $\beta$  [J]. Gastric Cancer, 2017, 20(1): 116-125.
- [6] SWAIN S M, BASELGA J, KIM S B, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer [J]. N Engl J Med, 2015, 372(8): 724-734.
- [7] WANG F W, LI B, FU P C, et al. Immunomodulatory and enhanced antitumor activity of a modified thymosin  $\alpha 1$  in melanoma and lung cancer [J]. Int J Pharm, 2018, 547(1-2): 611-620.
- [8] 宋晓丹,谭 令,崔晓江,等.乌司他丁联合多西他赛对乳腺癌免疫微环境的影响[J].重庆医科大学学报,2014,39(12):1794-1799.  
SONG X D, TAN L, CUI X J, et al. Effect of ulinastatin and docetaxel on immune microenvironment of breast cancer [J].

- J Chongqing Med Univ, 2014, 39(12): 1794–1799.
- [ 9 ] 黄玉钊, 陈义忠, 郑 曦, 等. 褪黑素对大鼠乳腺癌肿瘤生长的影响 [ J ] . 中国老年学杂志, 2018, 38(21): 5272–5275.  
HUANG Y D, CHEN Y Z, ZHENG X, et al. Effects of melatonin on tumor growth of rats breast cancer [ J ] . Chin J Gerontol, 2018, 38(21): 5272–5275.
- [ 10 ] VLADIMIROVA L, PODZOROVA N, NEPOMNYASCHAYA E, et al. The effectiveness of neoadjuvant chemotherapy with recombinant tumor necrosis factor–thymosin– $\alpha 1$  in locally advanced breast cancer and effect on tumor angiogenesis [ J ] . Ann Oncol, 2016, 27 (suppl\_6): vi96.
- [ 11 ] GUO Y, CHANG H, LI J, et al. Thymosin alpha 1 suppresses proliferation and induces apoptosis in breast cancer cells through PTEN–mediated inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [ J ] . Apoptosis, 2015, 20(8): 1109–1121.
- [ 12 ] WANG F W, YU T T, ZHENG H, et al. Thymosin alpha1–Fc modulates the immune system and down–regulates the progression of melanoma and breast cancer with a prolonged half–life [ J ] . Sci Rep, 2018, 8(1): 12351.
- [ 13 ] LEONE K, POGGIANA C, ZAMARCHI R. The interplay between circulating tumor cells and the immune system: from immune escape to cancer immunotherapy [ J ] . Diagnostics (Basel), 2018, 8(3): E59.
- [ 14 ] ROOK G A W, DALGLEISH A. Infection, immunoregulation, and cancer [ J ] . Immunol Rev, 2011, 240(1): 141–159.
- [ 15 ] LIU C, WANG Q, SUN B, et al. Low BMI is correlated with increased TGF– $\beta$  and IL–10 mRNA levels in the peripheral blood of breast cancer patients [ J ] . IUBMB Life, 2018, 70(3): 237–245.
- [ 16 ] THABET N M, MOUSTAFA E M. Synergistic effect of ebselen and gamma radiation on breast cancer cells [ J ] . Int J Radiat Biol, 2017, 93(8): 784–792.
- [ 17 ] DUCHNOWSKA R, PEKSA R, RADECKA B, et al. Immune response in breast cancer brain metastases and their microenvironment: the role of the PD–1/PD–L axis [ J ] . Breast Cancer Res, 2016, 18(1): 43.
- [ 18 ] THOMPSON E D, TAUBE J M, ASCH–KENDRICK R J, et al. PD–L1 expression and the immune microenvironment in primary invasive lobular carcinomas of the breast [ J ] . Mod Pathol, 2017, 30(11): 1551–1560.

( 收稿日期: 2020–10–23 修回日期: 2021–05–08 )