



· 论 著 ·

NOD1通过重塑肿瘤相关巨噬细胞免疫微环境促进乳腺癌进展

李董婧¹, 马伟^{1, 2, 3}, 许佳慧¹, 邓乔丹¹, 柳素玲¹

1. 浙江大学医学院, 浙江大学医学院附属第一医院浙江省胰腺病研究重点实验室, 浙江 杭州 311100;
2. 复旦大学生物医学研究院, 上海 200032;
3. 复旦大学附属肿瘤医院肿瘤研究所, 复旦大学上海医学院肿瘤学系, 上海 200032

[摘要] 背景与目的: 乳腺癌是危害女性健康及生命的主要恶性肿瘤之一, 其发病率位居女性癌症前列。核苷酸结合寡聚化结构域样蛋白1 (nucleotide-binding oligomerization domain containing 1, NOD1) 属于模式识别受体家族, 参与调节多种癌症的免疫微环境。然而, NOD1对乳腺癌免疫微环境的调控作用和机制尚不清楚。本研究旨在探索乳腺癌NOD1对其免疫微环境中肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophages, TAM) 的影响, 并探讨此影响的具体机制。方法: 利用公共数据库分析和多重免疫组织化学 (multiplex immunohistochemistry, mIHC) 评估人乳腺癌NOD1表达水平与免疫浸润的相关性。通过多色流式细胞术分析过表达NOD1的移植瘤样本中免疫细胞的组成与变化。采用趋化实验模型和定量反转录聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 在体外探究过表达NOD1的乳腺癌细胞对巨噬细胞趋化和极化功能的影响。构建原位移植瘤模型, 采用流式细胞术分析乳腺癌移植瘤NOD1对巨噬细胞的募集和极化情况的影响。利用荧光活化细胞分选技术 (fluorescence-activated cell sorting, FACS) 分选过表达NOD1的乳腺癌干细胞预处理的巨噬细胞并与普通乳腺癌细胞构建共培养模型, 使用流式细胞术检测NOD1驯化的巨噬细胞对乳腺癌细胞干性的影响。结果: 公共数据库分析及多色流式细胞术结果显示, NOD1与TAM的浸润具有相关性 ($P < 0.01$)。体外功能实验显示, 过表达NOD1的乳腺癌细胞能显著促进巨噬细胞的趋化 ($P < 0.001$), 并显著上调M2型巨噬细胞标志物的表达。与对照组相比, 过表达NOD1的乳腺癌移植瘤可显著富集巨噬细胞, 并促进其向M2表型的极化 ($P < 0.01$)。同时, NOD1驯化的巨噬细胞又能作用于肿瘤细胞, 通过上调乳腺癌细胞中乳腺癌干细胞的比例 ($P < 0.05$), 促进乳腺癌的恶性进展。结论: 乳腺癌中NOD1通过招募巨噬细胞并诱导其向M2型TAM极化重塑免疫微环境, 同时, NOD1驯化的巨噬细胞可增强乳腺癌细胞的干性, 促进乳腺癌进展。NOD1是乳腺癌的潜在治疗靶点之一。

[关键词] 乳腺癌; 核苷酸结合寡聚化结构域样蛋白1; 肿瘤相关巨噬细胞; 免疫微环境; 癌干细胞

中图分类号: R737.9 文献标志码: A

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2026.01.005

基金项目: 上海市抗癌协会“雏鹰”计划 (SACA-CY23B07); 国家自然科学基金青年项目 (82403662, 82303543)。

利益冲突: 作者声明无利益冲突。

伦理批件: 050432-4-2307E。

知情同意: 有。

引用本文: 李董婧, 马伟, 许佳慧, 等. NOD1通过重塑肿瘤相关巨噬细胞免疫微环境促进乳腺癌进展 [J]. 中国癌症杂志, 2026, 36(1): 47-56.

CC协议: CC BY-NC-ND 4.0。

Funding: Shanghai Anticancer Association EYAS PROJECT (SACA-CY23B07); National Natural Science Foundation of China (82403662, 82303543)

Conflicts of interest: authors declare no conflicts of interest.

Ethical approval: 050432-4-2307E.

Informed consent: available.

Cite this article: LI D J, MA W, XU J H, et al. NOD1 promotes breast cancer progression through remodeling tumor-associated macrophage in tumor immune microenvironment [J]. Chin Oncol, 2026, 36(1): 47-56.

CC license: CC BY-NC-ND 4.0.

NOD1 promotes breast cancer progression through remodeling tumor-associated macrophage in tumor immune microenvironment LI Dongjing¹, MA Wei^{1, 2, 3}, XU Jiahui¹, DENG Qiaodan¹, LIU Suling¹ (1. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Pancreatic Disease, The First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 311100, Zhejiang Province, China; 2. Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China;

3. Cancer Institute, Fudan University Shanghai Cancer Center, Department of Oncology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Correspondence to: LIU Suling E-mail: suling@zju.edu.cn

[**Abstract**] **Background and purpose:** Breast cancer is one of the leading malignancies affecting women's health, with high incidence. Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1 (NOD1), a member of the pattern recognition receptor family, is involved in regulating the immune microenvironment in various cancers. However, the specific regulatory functions and mechanisms of *NOD1* in the breast cancer immune microenvironment remain unclear. This study aimed to investigate the effects of NOD1 on tumor-associated macrophages (TAM) within the breast cancer immune microenvironment and to explore the underlying mechanisms involved. **Methods:** The public databases and multiplex immunohistochemistry (mIHC) were utilized to analyze the correlation between *NOD1* expression and immune infiltration in human breast cancer. Multicolor flow cytometry was performed to assess the immune cell composition and changes in NOD1-overexpressing breast tumor allografts. *In vitro*, chemotaxis assays and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) were used to evaluate the effect of NOD1-overexpressing breast cancer cells on macrophage chemotaxis and polarization. Additionally, the effect of NOD1 on macrophage recruitment and polarization in breast tumor allografts was assessed by flow cytometry. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) was used to isolate macrophages pre-conditioned by NOD1-overexpressing breast cancer stem cells, which were then cocultured with parental breast cancer cells. Flow cytometry was used to assess the impact of NOD1-conditioned macrophages on the stemness of breast cancer cells. **Results:** The database analysis and multicolor flow cytometry results demonstrated significant correlations between *NOD1* expression and TAM infiltration ($P < 0.01$). *In vitro* functional assays of macrophages demonstrated that NOD1-overexpressing breast cancer cells enhanced macrophage chemotaxis ($P < 0.001$) and upregulated the expression of M2 macrophage markers. Compared with control groups, NOD1-overexpressing breast tumor allografts showed increased macrophage infiltration and polarization ($P < 0.01$). NOD1-educated macrophages promoted malignant progression of breast cancer by increasing the proportion of breast cancer stem cells ($P < 0.05$). **Conclusion:** In breast cancer, NOD1 remodels the immune microenvironment by recruiting macrophages and inducing their polarization towards the M2 phenotype. Furthermore, NOD1-educated macrophages enhance breast cancer cell stemness, thereby accelerating tumor progression. NOD1 represents a potential therapeutic target in breast cancer.

[**Key words**] Breast cancer; Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1; Tumor-associated macrophages; Immune microenvironment; Cancer stem cell

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率均位居女性癌症的前列^[1]。目前, 发生远处转移的晚期乳腺癌患者仍不可完全治愈^[2]。近年来肿瘤的免疫疗法不断发展, 免疫检查点阻断 (immune checkpoint blockade, ICB) 等免疫疗法的应用在一定程度上改善了乳腺癌患者的预后^[3-4]。然而, 受到肿瘤免疫微环境 (tumor immune microenvironment, TIME) 组分、肿瘤免疫原性等的影响, 免疫治疗面临着长期疗效难维持、治疗耐受等瓶颈, 阐明乳腺癌与免疫微环境的相互作用机制是解决这些问题的关键^[5-7]。

作为TIME的核心组分, 免疫细胞通过复杂的调控网络参与肿瘤发展、转移及耐药等关键病理学过程^[4]。其中, 肿瘤相关巨噬细胞 (tumor-associated macrophage, TAM) 的调控机制具有典型意义, 有研究^[8]表明, 肿瘤能够通过多种信号通路募集并激活巨噬细胞, 促使其极化为促肿瘤的M2样表型。同时, 此类TAM可通过三重作用机制促进肿瘤进展: ①分泌血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 诱导血管生成; ②释放基质金属蛋白酶 (matrix

metalloproteases, MMP) 介导细胞外基质重塑; ③表达程序性死亡蛋白配体-1 (programmed death ligand-1, PD-L1) 等免疫检查点分子抑制T细胞功能^[9]。在乳腺癌中, 乳腺癌细胞能够通过募集和极化TAM以重塑免疫抑制微环境^[10]。这种免疫细胞的重编程现象为探索靶向肿瘤微环境的联合治疗策略提供了新的切入点。

核苷酸结合寡聚化结构域样蛋白1 (nucleotide-binding oligomerization domain containing 1, NOD1) 属于模式识别受体家族, 是机体先天性免疫的重要组成部分^[11]。NOD1蛋白可识别多种细菌细胞壁中的保守片段, 招募信号分子激活下游经典核因子- κ B (Nuclear Factor Kappa-B, NF- κ B) 信号通路, 驱动机体产生炎症反应^[12-13]。临床数据分析显示, 乳腺癌细胞中NOD1的高表达与接受新辅助化疗患者不良预后显著相关。机制研究^[14]进一步揭示, NOD1作为乳腺癌干细胞中高表达的特征分子, 可通过增强肿瘤细胞干性、提升其化疗耐药性等方式促进乳腺癌的恶性进展。同时, 近期研究^[15-16]显示, NOD1在结直肠癌、肝细胞癌等癌症的免疫微环境调节中也发挥重要作用: 在肠

炎诱导肠癌的小鼠模型中，肿瘤浸润的骨髓来源的抑制性细胞（myeloid-derived suppressor cells, MDSC）的NOD1在炎癌转化过程中被激活，调控小鼠局部形成免疫抑制微环境，促进结肠癌发展；肝癌TAM中NOD1的激活可导致细胞内游离脂肪酸的积累，促进相关分子的膜定位，最终激活CD8⁺ T淋巴细胞介导的抗肿瘤免疫。然而，NOD1是否通过重塑免疫微环境以促进乳腺癌的恶性进程目前尚不清楚，有待进一步探索。本研究旨在利用体内、体外实验揭示乳腺癌细胞中NOD1m表达水平与TIME塑造的关系，期望为解析乳腺癌进展的具体机制提供新见解，并为新治疗策略的开发提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 组织样本

本实验所采用的13例原位乳腺癌患者的组织样本石蜡切片来自复旦大学附属肿瘤医院。本研究经复旦大学附属肿瘤医院医学伦理委员会审查批准（伦理批号：050432-4-2307E），患者均已签署知情同意书。

1.1.2 细胞及小鼠

人源性乳腺癌细胞系SUM159购自美国Asterland Bioscience公司，人源性乳腺癌细胞系MDA-MB-231、人源性急性单核细胞白血病细胞系THP-1、鼠源性乳腺癌细胞系4T1均购自美国典型培养物保藏中心（American Type Culture Collection, ATCC）细胞库。

1.1.3 主要试剂和耗材

DMEM、RPMI-1640、Han's F12、胎牛血清（fetal bovine serum, FBS）均购自美国Gibco公司，磷酸缓冲盐溶液（phosphate-buffered saline, PBS）、嘌呤霉素均购自美国Sigma-Aldrich公司，100×链霉素-青霉素溶液购自碧云天生物技术（上海）有限公司，胰岛素、4',6-二脒基-2-苯基吲哚（4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI）均购自北京兰杰柯科技有限公司，氢化可的松购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司，佛波酯（phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA）购自美国MedChemExpress公司，酪酰胺信号放大（tyramide signal amplification, TSA）多重免疫荧光/多重免疫组织化学（multiplex immunohistochemistry, mIHC）试剂盒、即用型TSA荧光六标七色试剂盒、mIHC专用抗体洗脱液均购自碱基天工（上海）生物科技有限公司，

非连接酶依赖的一步克隆试剂盒、第二代高效全长cDNA一步合成试剂盒、AceQ通用型qPCR预混液均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司，RNAiso Plus购自宝日医生物技术（北京）有限公司，Transwell小室购自美国Corning公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

SUM159细胞在含有5% FBS、1%链霉素-青霉素、5 mg/mL胰岛素和1 μg/mL氢化可的松的Han's F12培养基中培养；MDA-MB-231细胞和4T1细胞在含有5% FBS、1%链霉素-青霉素、4 μg/mL庆大霉素的RPMI-1640培养基中培养；THP-1细胞在含有10% FBS、1%链霉素-青霉素的RPMI-1640培养基中培养；HEK-293T细胞在含有10% FBS、1%链霉素-青霉素的DMEM培养基中培养。所有细胞均置于37 °C、CO₂体积分数为5%的细胞培养箱中培养，当细胞汇合度达到80%左右时进行传代。使用THP-1进行趋化实验、共培养前需诱导其分化为巨噬细胞，将THP-1维持在PMA浓度为185 ng/mL的完全培养基中6 h即可用于后续实验。

1.2.2 质粒构建、慢病毒生产和转染

使用SUM159细胞系的cDNA扩增人NOD1全长开放阅读框，利用一步克隆试剂盒将其克隆到pSIN-EF1a-IRES-Puro载体中，在NOD1的C端引入FLAG标签。使用聚乙烯亚胺进行转染。当HEK-293T细胞汇合度达到80%左右时，按核心质粒：包装质粒（psPAX2）：包膜质粒（pMD2.G）=10：6：3的比例计算各质粒用量，共转染至HEK-293T细胞中，产生高滴度的慢病毒，使用慢病毒转染乳腺癌细胞，使用嘌呤霉素筛选并得到稳定转入目的基因的细胞系。

1.2.3 趋化实验和共培养实验

对于趋化实验，使用8 μm孔径的24孔transwell小室与24孔板构建巨噬细胞的趋化测定模型。将SUM159细胞（2×10⁴个细胞/孔）接种于下室，将已诱导THP-1（1×10⁵个细胞/孔）接种于上室。培养18~24 h后，擦除留在transwell小室上膜的未募集THP-1。募集到下膜表面的THP-1用4%多聚甲醛固定液固定，随后使用0.1%结晶紫染色。洗涤后，使用显微镜对募集细胞成像，并使用Image J软件计数。对于共培养实验，将已诱导的THP-1（2×10⁴细胞/板）与乳腺癌细胞（5×10⁴细胞/板）在10 cm培养皿中混合培养5 d，以CD45作为标志物分选出巨噬细胞用于后续定量反转录聚合酶链反应（quantitative real-

time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测和流式细胞术分析。

1.2.4 流式细胞术和荧光活化细胞分选技术 (fluorescence-activated cell sorting, FACS)

为实现移植瘤样本中乳腺癌细胞的解离, 用摇床在37 °C下消化肿瘤1 h, 用40 μm滤网过滤细胞悬液、去除聚集体。使用氯化铵溶液在室温下裂解红细胞5 min, 以336×g离心5 min, 将肿瘤组织制成单细胞悬液用于后续分析。进行移植瘤的多色流式细胞术分析时, 使用CD45.2、CD11b、Gr-1、F4/80、MHCII、CD11c、NKp46、CD19、CD3、CD4、CD8a、TIM3、PD-1和PD-L1抗体标记收获的单细胞。将样品悬浮于含有2% FBS和DAPI的1×PBS中, 使用40 μm细胞滤网过滤后上机检测。

对于巨噬细胞的分析, 使用CD45、CD11b、F4/80和MHCII抗体标记巨噬细胞, 随后对样本进行固定和破膜处理, 再使用CD206抗体标记巨噬细胞。将样品悬浮于含有2% FBS和DAPI的1×PBS中, 使用40 μm细胞滤网过滤后上机检测。若需从混合共培养模型中分离出巨噬细胞, 仅采用CD45抗体标记即可。

对于乳腺癌细胞的乙醛脱氢酶 (acetaldehyde dehydrogenase, ALDH) 活性检测, 将解离的单细胞重悬于含有底物BAAA (BODIPY-aminoacetaldehyde) 的ALDEFLUOR缓冲液中, 每样本设置加入DEAB的阴性对照, 并在37 °C培养箱中温育40 min。染色后, 将样品悬浮于含有2% FBS和DAPI的1×PBS中, 使用40 μm细胞滤网过滤后进行检测。

所有的流式细胞术和FACS均使用MoFlo Astrios或CytoFlex分析仪进行, 并通过FlowJo 10.8.1软件进行数据处理。

1.2.5 总RNA抽提和qRT-PCR

使用RNAiso Plus从肿瘤细胞中提取总RNA, 并使用HiScript II第1链cDNA合成试剂盒将总RNA反转录为cDNA。采用AceQ Universal SYBR qPCR预混液进行qRT-PCR, 并使用7300Plus qRT-PCR系统 (Applied Biosystems) 收集荧光信号。iNOS基因的上游引物序列为5'-CAGCGGGATGACTTTCCAA-3', 下游引物序列为5'-AGGCAAGATTTGGACCTGCA-3'; IRF5基因的上游引物序列为5'-GGGCTTCAATGGGTCAACG-3', 下游引物序列为5'-GCC TTCGGTGTATTTCCCTG-3'; IRF4的上游引物序列为5'-AGCGCATTTCAGTAAATGTAAACACA

T-3', 下游引物序列为5'-TCTTGTGTTCTGTA GACTGCCATCA-3'; CD206的上游引物序列为5'-TTCGGACACCCATCGGAATTT-3', 下游引物序列为5'-CACAAAGCGCTGCGTGGAT-3'; 内参照 tubulin 蛋白的上游引物序列为5'-GCACAGGAGCCAAGAGTGAA-3', 下游引物序列为5'-CACATCACAGCTCCCCACCA-3'。所有引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法比较目的基因的相对表达量。

1.2.6 小鼠和体内模型

4~5周龄的雌性BALB/c小鼠或NSG小鼠均购自北京维通利华实验动物技术有限公司。在23~25 °C、无特定病原体的环境下将小鼠饲养于标准动物笼中, 在复旦大学实验动物中心进行12 h的光照-黑暗循环。动物实验按照复旦大学实验动物护理指南进行, 且经复旦大学附属肿瘤医院机构审查委员会批准 (JS-113), 经复旦大学实验动物科学部动物实验伦理审查 (202401FS0002)。将乳腺癌细胞悬液原位接种于小鼠第4对乳腺脂肪垫处以获得乳腺癌原位移植模型, 定期测量肿瘤大小, 当肿瘤直径达到10~15 mm时采用颈椎脱臼法处死小鼠, 收取样本进行后续分析。

1.2.7 mIHC分析

使用WASci即用型TSA荧光六标七色试剂盒中的单色荧光染料TSA-650、TSA-620、TSA-520进行切片荧光染色。组织切片依次进行脱蜡与水化、内源性过氧化物酶阻断及抗原修复处理。随后使用3%牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 室温封闭非特异性位点, 进行抗体温育: 首先使用鼠源CD68一抗与辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠二抗温育, 随后采用单色荧光染料TSA-650进行荧光染色, 使用mIHC专用抗体洗脱液去除抗体复合物。重复上述步骤, 依次进行ARG1 (TSA-520) 和NOD1 (TSA-570) 的染色。全部染色结束后, 使用1×PBS清洗切片, 稍干后以含DAPI的抗荧光淬灭封固剂封固。使用Akoya Phenocycler Fusion多重荧光成像系统在同一曝光条件下采集图像, 并基于荧光强度与阳性面积对各标志物进行定量分析。

1.3 统计学处理

采用GraphPad Prism 6.0软件进行图像处理和统计学分析。对本研究的所有计量资料进行正态性检验, $n \leq 50$ 时采用Shapiro-Wilk检验, $n > 50$

时采用Kolmogorov-Smirnov检验,符合正态分布者采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,2组间数据比较采用Student *t*检验,3组及以上数据比较采用方差分析。不符合正态分布者以Median (Q1, Q3)表示,2组间数据比较采用非参数Mann-Whitney U检验,3组及以上数据比较采用Kruskal-Wallis检验。变量间的相关性采用Spearman秩相关分析,并报告相关系数(Rho)及其显著性(*P*值),采用散点图对结果进行可视化。所有检验均为双侧, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌组织中NOD1表达水平与M2型巨噬细胞的浸润呈显著正相关

为探究乳腺癌NOD1表达水平与免疫浸润的关系,本研究采用肿瘤免疫评估资源(Tumor Immune Estimation Resource, TIMER)平台对癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库中1100例乳腺癌样本的RNA-seq数据进行了相关性分析。结果显示,乳腺癌NOD1表达水平与调节性T(regulatory T, Treg)细胞、MDSC、M1型巨噬细胞的浸润呈弱负相关($Rho<0, P<0.05$),与M2型巨噬细胞的浸润呈显著正相关($Rho>0.3, P<0.001$,图1A)。已有研究^[8]证明巨噬细胞能够接受多种信号刺激极化为M2表型的TAM以促进肿瘤发展,因此,我们推测乳腺癌中NOD1可能通过调节巨噬细胞功能,塑造利于乳腺癌发展的免疫微环境。为验证乳腺癌NOD1表达水平与M2型巨噬细胞浸润情况的关系,本研究收集了复旦大学附属肿瘤医院收治的13例原位乳腺癌患者的组织样本切片进行mIHC分析。结果显示,NOD1(绿色)与巨噬细胞标志物CD68(红色)及M2型巨噬细胞标志物ARG1(橙色,图1B)显著共定位。定量分析进一步表明,CD68与ARG1的表达水平均与乳腺癌NOD1表达水平呈正相关($P<0.001$,图1C),提示乳腺癌NOD1表达水平与M2型巨噬细胞的浸润密切相关,并可能在其功能调控中发挥重要作用。

2.2 过表达NOD1的乳腺癌移植瘤中巨噬细胞的状态发生显著变化

为进一步分析NOD1对乳腺癌免疫微环境组成的影响,本研究构建了过表达NOD1的乳腺癌原位移植瘤模型,对移植瘤中的免疫细胞进行了多色流式细胞术分析。结果显示,过表达NOD1的移植瘤样本中存在T细胞、B细胞、自然杀伤

(natural killer, NK)细胞、MDSC、巨噬细胞、树突状细胞等多种免疫细胞的浸润,但与对照组相比较无明显组成上的差异(图2B)。过表达组中T细胞、NK细胞、DC细胞的比例与群体定位出现一定程度的改变(图2C、2G、2H);B细胞、Tc1细胞、Treg细胞、MDSC变化不明显(图2D、2E、2F、2I)。巨噬细胞在两组中均占据较高比例,且其表型变化最为复杂,是组间差异显著的群体之一(图2A、2J),过表达组巨噬细胞的分布重心从偏右变为偏左,提示巨噬细胞状态与定位发生变化。此外,M1型巨噬细胞标志物MHCII的分布发生改变,在巨噬细胞的主要群体中MHCII明显下调(图2J),提示乳腺癌NOD1对TAM相关功能具有重要影响。上述结果表明,乳腺癌中NOD1可能主要通过调节巨噬细胞功能和亚群定位以重塑乳腺癌免疫微环境。

2.3 过表达NOD1的乳腺癌细胞能够增强巨噬细胞的趋化和极化功能

为探究过表达NOD1的乳腺癌细胞对免疫微环境中巨噬细胞趋化和极化功能的影响,本研究分别采用趋化实验和共培养模型进行分析。结果显示,NOD1过表达组的巨噬细胞穿膜数量显著上升(图3A, $P<0.001$),说明乳腺癌细胞中过表达NOD1能够显著增强巨噬细胞的趋化功能。在与过表达NOD1的乳腺癌细胞共培养后,巨噬细胞中M2型标志物CD206和IRF4的mRNA表达明显上调(图3B),提示过表达NOD1的乳腺癌细胞在体外能够驱动巨噬细胞向M2表型极化。在体内实验中,过表达NOD1的4T1乳腺癌移植瘤组织内巨噬细胞($CD11b^+F4/80^+, P<0.01$)及M2型巨噬细胞($F4/80^+CD206^+, P<0.01$)比例均显著升高(图3C)。此外,NOD1敲降的MDA-MB-231乳腺癌移植瘤中M1型巨噬细胞($CD11b^+MHCII^+$)呈下调趋势(图3D)。以上结果说明,乳腺癌细胞能够通过NOD1招募巨噬细胞并促进其向M2表型极化以重塑乳腺癌的免疫微环境。

2.4 过表达NOD1的乳腺癌干细胞驯化的巨噬细胞增强乳腺癌细胞干性

我们的前期研究^[14]显示,NOD1在ALDH⁺乳腺癌干细胞中高表达,是乳腺癌干性相关基因之一,与乳腺癌的复发和耐药密切相关。因此,本研究从过表达NOD1的乳腺癌细胞系中分选出ALDH⁺乳腺癌干细胞,将其与巨噬细胞共培养,收集过表达NOD1的ALDH⁺乳腺癌干细胞驯化的巨噬细胞与乳腺癌细胞系混合共培养,检测共培

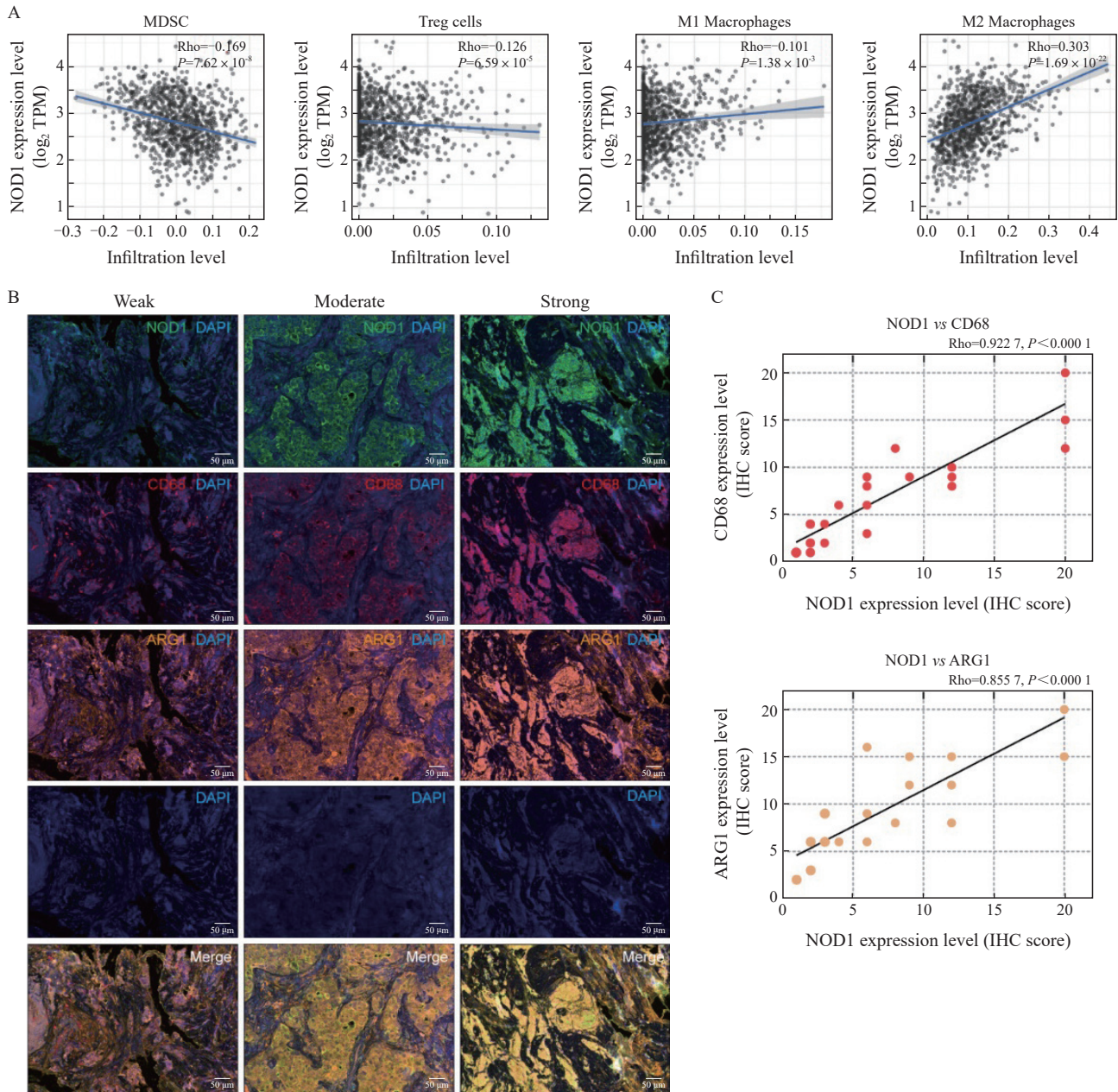


图1 乳腺癌NOD1表达水平与免疫浸润的关系

Fig. 1 The correlation between *NOD1* expression and immune cell infiltration in breast cancer

A: The correlation between *NOD1* expression and immune cell infiltration in breast cancer was analyzed by TIMER platform on RNA-seq data from the TCGA database. $P > 0.05$: No significance, assessed by Spearman's rank correlation coefficient; $Rho > 0$, $P < 0.05$: Positive correlation, assessed by Spearman's rank correlation coefficient; $Rho < 0$, $P < 0.05$: Negative correlation, assessed by Spearman's rank correlation coefficient; $|Rho| > 0.3$, $P < 0.05$: Strong correlation, assessed by Spearman's rank correlation coefficient. B: Co-localization of *NOD1* (green) with CD68 (red) and ARG1 (orange) in breast cancer tissues by mIHC. Nuclei are stained with DAPI (blue). C: Correlation of *NOD1* expression with CD68 (left) and ARG1 (right). The expression level of each marker was quantified by IHC scores integrating fluorescence intensity and positive area. $Rho > 0$, $P < 0.05$: Positive correlation, assessed by Spearman's rank correlation coefficient.

养后乳腺癌细胞的ALDH活性(图4A),结果显示,在过表达NOD1的乳腺癌干细胞共培养组中分离的巨噬细胞诱导下,乳腺癌细胞中ALDH⁺乳腺癌干细胞的比例显著升高,表明由过表达NOD1的乳腺癌干细胞驯化的巨噬细胞能够显著增强乳腺癌细胞的干性($P < 0.05$,图4B和C)。

3 讨论

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤,全球乳腺癌发病率逐年上升,这种趋势似乎仍在持续。尽管

针对乳腺癌已经进行了大量研究,治疗手段也不断完善进步,但发生远处器官转移的晚期乳腺癌仍然缺乏有效的治疗手段,患者预后较差,亟待寻找可靠而有效的治疗策略^[2]。

近年来,乳腺癌的免疫治疗不断发展,在免疫检查点抑制剂(immun checkpoint inhibitors, ICI)和抗体药物偶联物(antibody-drug conjugates, ADC)问世后,基于乳腺癌免疫治疗的临床试验数量不断增加^[4]。然而,免疫治疗的效果受到TIME中免疫细胞表型和功能

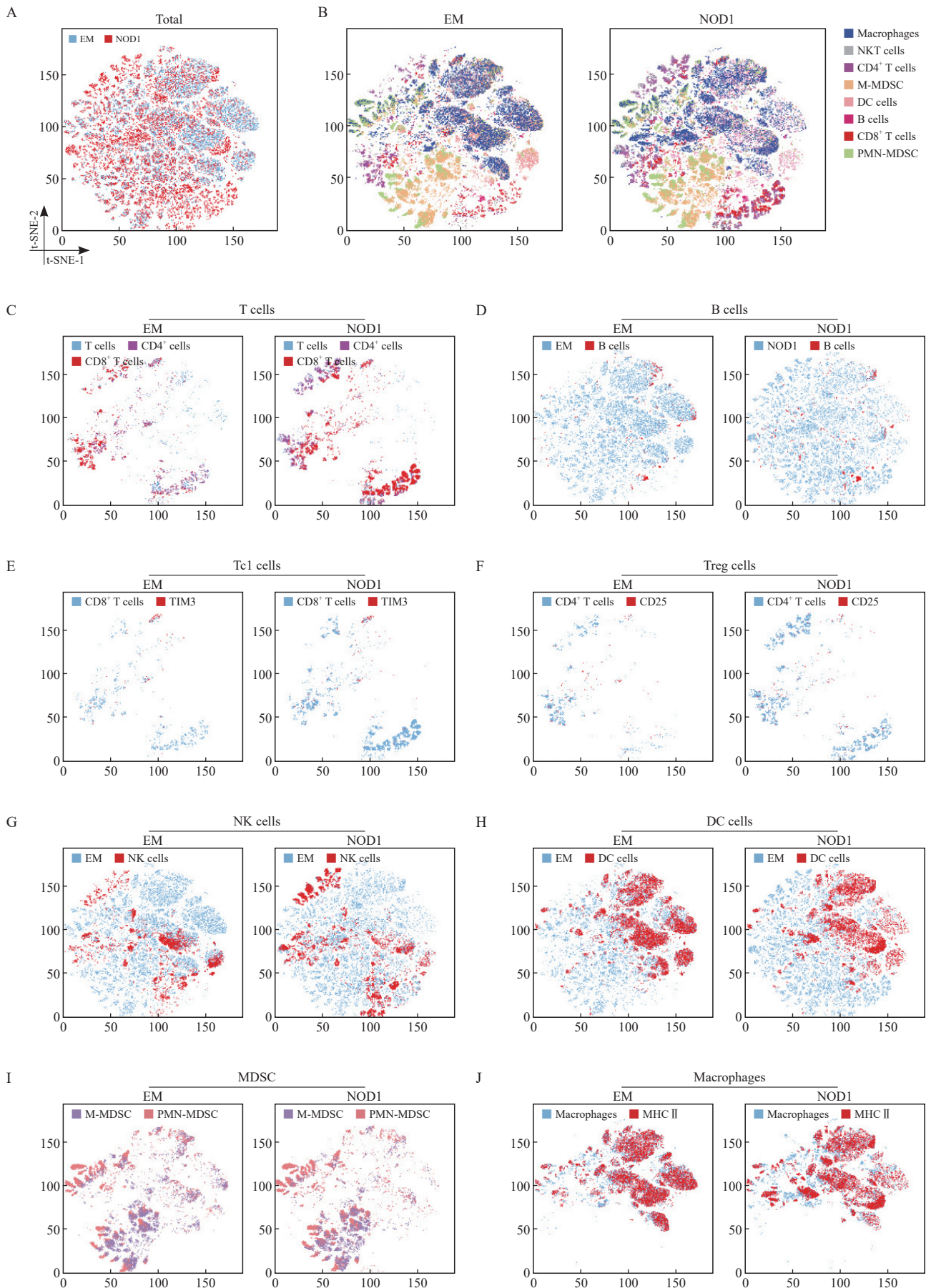


图2 NOD1过表达对乳腺癌移植瘤中免疫细胞浸润的影响

Fig. 2 Effect of NOD1 overexpression on the immune cell infiltration in breast tumor allografts

A, B: Flow cytometry analysis of immune cells in breast tumor allografts. C~J: Flow cytometry analysis of T cells (C), B cells (D), Tc1 cells (E), Treg cells (F), NK cells (G), DC cells (H), MDSC (I) and Macrophage (J). Axes labels are shown in panel A only and apply to all panels. The t-SNE-1 and t-SNE-2 axes are unitless dimensions representing the relative similarity between cells in high-dimensional space.

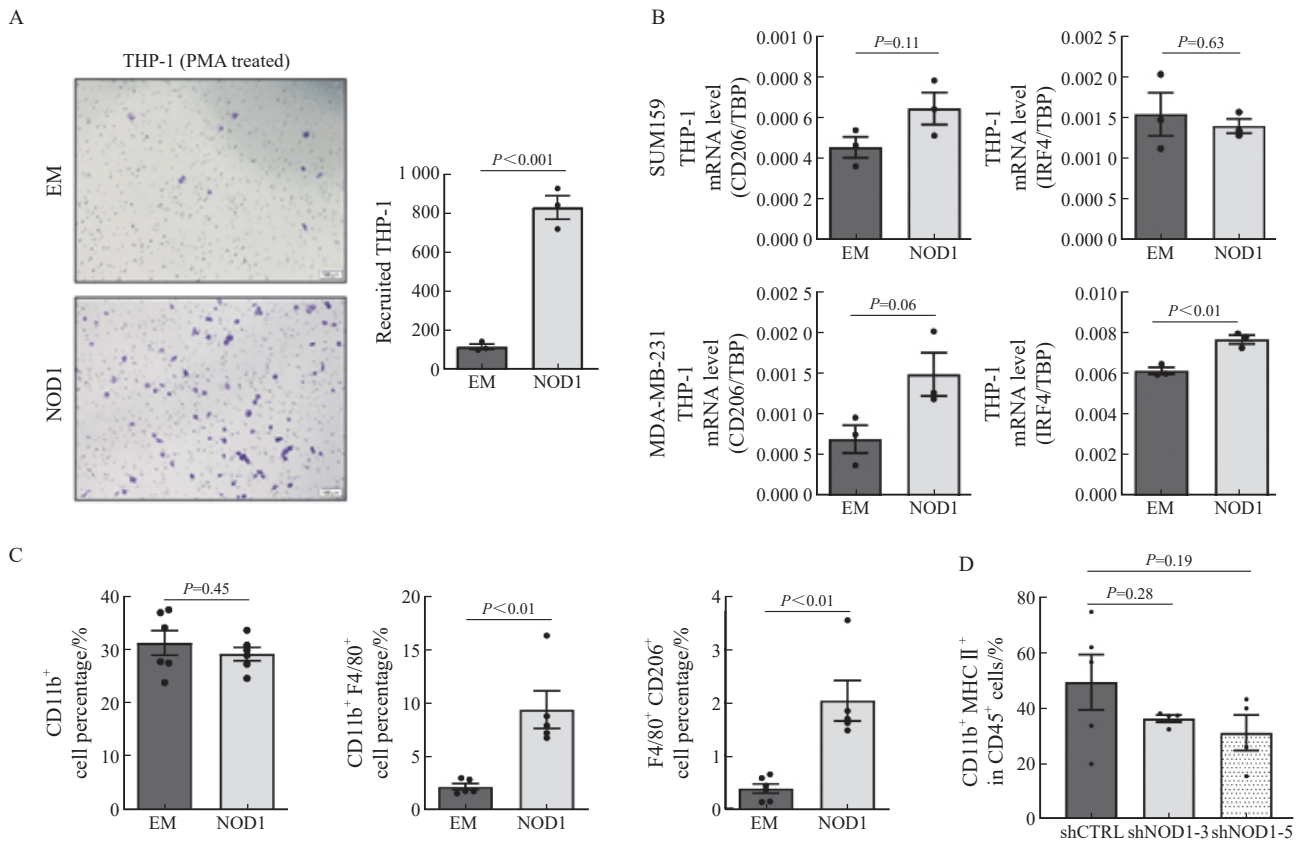


图3 过表达NOD1的乳腺癌细胞对巨噬细胞趋化与极化功能的影响

Fig. 3 Effects of NOD1 overexpression in breast cancer cells on the chemotaxis and polarization of macrophages

A: The chemotaxis of THP-1(PMA treated) with or without NOD1-overexpressed cancer cell treatment was assessed by chemotaxis assay. B: mRNA levels of M2-type polarization markers in THP-1(PMA treated) with or without NOD1-overexpressed cancer cell treatment. C, D: Flow cytometry analysis of the macrophages in breast tumor allografts.

的显著影响，其中，抑制性免疫细胞的浸润是癌症对免疫疗法产生治疗抵抗的关键^[17]。癌症中常见抑制性免疫细胞群体包括Treg细胞、M2型TAM和MDSC等^[4, 7]。在乳腺癌中，M2型TAM的富集能够塑造免疫抑制微环境以促进乳腺癌发展，靶向此类抑制性免疫细胞可以延缓肿瘤的恶性进展^[10, 18]。我们期望探明乳腺癌与TIME中免疫细胞的相互作用机制，为相关治疗策略提供理论依据。

NOD1是核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族的成员，参与机体对多种微生物的抗感染免疫反应^[19-20]。多项研究表明，NOD1及其下游分子RIP2对乳腺癌的转移、耐药具有重要作用^[21-22]。我们过去的研究^[14]证明了NOD1在乳腺癌干细胞中高表达，能够增强乳腺癌细胞的干性和化疗耐药性，在乳腺癌恶性进程中发挥重要作用。然而，NOD1受体是否参与乳腺癌与免疫微环境的相互作用过程尚不清楚。本研究对TCGA数据库中的RNA-seq数据进行分析，对13例原位乳腺癌患者的组织样本切片进行mIHC染色，发现乳腺癌组织中NOD1的表达水平与M2型

巨噬细胞的浸润显著相关；对过表达NOD1的乳腺癌移植瘤样本进行多色流式细胞术分析，发现乳腺癌细胞NOD1表达水平对巨噬细胞的功能及亚群定位具有潜在影响。

巨噬细胞是肿瘤中募集的主要免疫细胞类型之一，具有表型和功能上的多样性。有研究^[23]证明，巨噬细胞可被各种信号激活并极化为M1样或M2样表型的TAM。本研究通过趋化模型及表型测定在体内外探究了乳腺癌过表达NOD1对巨噬细胞趋化和极化功能的影响。结果显示，乳腺癌在体内外均能通过NOD1增强巨噬细胞的趋化功能并促进其向M2型TAM极化。本研究在体外构建共培养模型以探究NOD1驯化的巨噬细胞对乳腺癌细胞的反作用，发现受过表达NOD1的乳腺癌干细胞调控的巨噬细胞能够显著上调乳腺癌细胞的干性，提示乳腺癌可通过NOD1调节巨噬细胞的功能以重塑免疫微环境，并促进乳腺癌的恶性进展。然而，由乳腺癌NOD1介导的此种癌细胞-免疫细胞相互作用具体通过何种机制实现尚不清楚。综合现有证据，NOD1影响乳腺癌进展的机制可能涉及两方面：一方面是通过激活

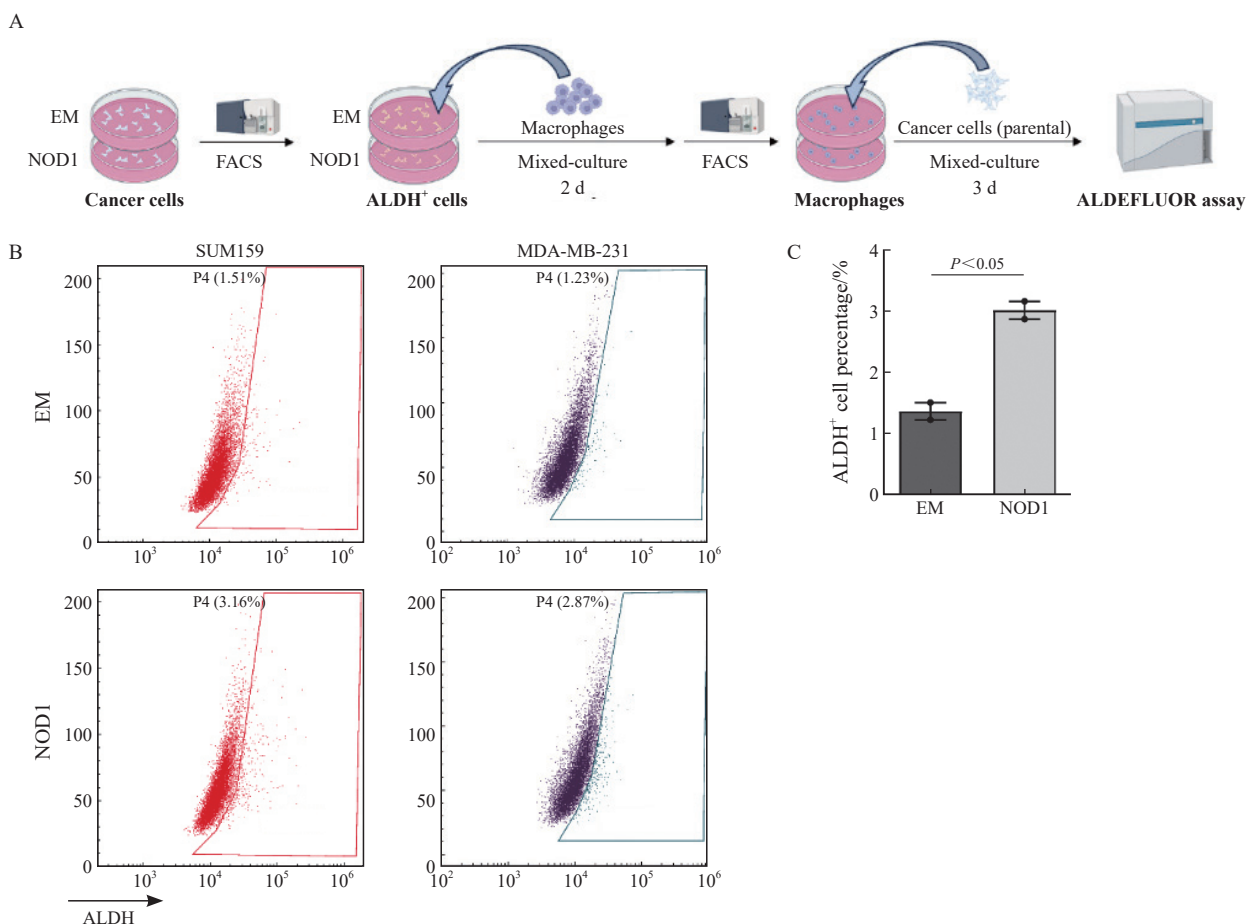


图4 过表达NOD1的乳腺癌干细胞驯化的巨噬细胞对乳腺癌细胞干性的影响

Fig. 4 NOD1-overexpressing breast cancer stem cell-educated macrophages modulate breast cancer cell stemness

A: Experimental flow diagram of continuous FACS and mixed-culture. B, C: Flow cytometry analysis of the percentage of ALDH⁺ breast cancer stem cells in breast cancer cell with or without NOD1-educated macrophages treatment.

NF- κ B等经典下游通路调控癌细胞干性和TAM功能；另一方面则可能通过NOTCH信号轴发挥作用。我们团队此前的研究^[14]表明，NOD1可能参与调控NOTCH1-HEY1信号轴。在乳腺癌中，NOTCH1已被证实可通过上调转录因子ERBB2的表达，增强乳腺癌干细胞的自我更新能力^[24]；该通路也参与微环境中MDSC、Treg细胞及TAM等免疫抑制细胞的功能调控^[25]。

然而，本研究仍存在一些局限。首先，NOD1调控巨噬细胞募集和极化的直接下游效应分子及信号轴尚未完全阐明；其次，针对NOD1功能的遗传学验证仍有待补充，以进一步增强结论的可靠性；最后，当前使用的鼠源移植瘤模型与人类TIME存在固有差异。因此，后续研究将在人源化小鼠等更具临床相关性的模型中，利用基因操作手段深入探索NOD1的具体作用机制，为确立靶向NOD1的乳腺癌治疗策略提供更坚实的理论基础。

综上所述，本研究发现乳腺癌细胞可通过

NOD1增强巨噬细胞的趋化功能，并促进其向M2型TAM极化，进而重塑免疫抑制微环境。

第一作者：

李董婧 (ORCID: 0009-0001-8273-7510)，学士。

通信作者：

柳素玲 (ORCID: 0000-0002-0475-0242)，研究员、博士研究生导师，E-mail: suling@zju.edu.cn。

作者贡献声明：

李董婧：撰写论文初稿，协助完成实验与数据分析；马伟：设计研究思路，完成实验并分析数据，修改初稿；许佳慧，邓乔丹：提供实验设计思路，协助完成实验数据分析；柳素玲：制定实验计划，监督实验并完成初稿的最终修订和审阅。

[参 考 文 献]

- [1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] HARBECK N, PENAULT-LLOORCA F, CORTES J, et al. Breast cancer [J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5: 66.

- [3] DEBIEN V, DE CALUWÉ A, WANG X X, et al. Immunotherapy in breast cancer: an overview of current strategies and perspectives [J] . NPJ Breast Cancer, 2023, 9(1): 7.
- [4] KUNDU M, BUTTI R, PANDA V K, et al. Modulation of the tumor microenvironment and mechanism of immunotherapy-based drug resistance in breast cancer [J] . Mol Cancer, 2024, 23(1): 92.
- [5] GONZALEZ H, HAGERLING C, WERB Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression [J] . Genes Dev, 2018, 32(19/20): 1267–1284.
- [6] BINNEWIES M, ROBERTS E W, KERSTEN K, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy [J] . Nat Med, 2018, 24(5): 541–550.
- [7] BATES J P, DERAKHSHANDEH R, JONES L, et al. Mechanisms of immune evasion in breast cancer [J] . BMC Cancer, 2018, 18(1): 556.
- [8] BISWAS S K, MANTOVANI A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm [J] . Nat Immunol, 2010, 11(10): 889–896.
- [9] PITTET M J, MICHELIN O, MIGLIORINI D. Clinical relevance of tumour-associated macrophages [J] . Nat Rev Clin Oncol, 2022, 19(6): 402–421.
- [10] XIA J, ZHANG L X, PENG X L, et al. IL1R2 blockade alleviates immunosuppression and potentiates anti-PD-1 efficacy in triple-negative breast cancer [J] . Cancer Res, 2024, 84(14): 2282–2296.
- [11] CARUSO R, WARNER N, INOHARA N, et al. NOD1 and NOD2: Signaling, host defense, and inflammatory disease [J] . Immunity, 2014, 41(6): 898–908.
- [12] GIRARDIN S E, TOURNEBIZE R, MAVRIS M, et al. CARD4/Nod1 mediates NF- κ B and JNK activation by invasive *Shigella flexneri* [J] . EMBO Rep, 2001, 2(8): 736–742.
- [13] PARK J H, KIM Y G, MCDONALD C, et al. RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs [J] . J Immunol, 2007, 178(4): 2380–2386.
- [14] MA W, ZHANG L, CHEN W L, et al. Microbiota enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-secreted BFT-1 promotes breast cancer cell stemness and chemoresistance through its functional receptor NOD1 [J] . Protein Cell, 2024, 15(6): 419–440.
- [15] MAISONNEUVE C, TSANG D K L, FOERSTER E G, et al. Nod1 promotes colorectal carcinogenesis by regulating the immunosuppressive functions of tumor-infiltrating myeloid cells [J] . Cell Rep, 2021, 34(4): 108677.
- [16] ZHANG F, JIANG Q Y, CAI J L, et al. Activation of NOD1 on tumor-associated macrophages augments CD8⁺ T cell-mediated antitumor immunity in hepatocellular carcinoma [J] . Sci Adv, 2024, 10(40): eadp8266.
- [17] BASU A, RAMAMOORTHY G, JIA Y, et al. Immunotherapy in breast cancer: current status and future directions [M] // Immunotherapy of Cancer. Amsterdam: Elsevier, 2019: 295–349.
- [18] LIU C C, QIANG J K, DENG Q D, et al. ALDH1A1 activity in tumor-initiating cells remodels myeloid-derived suppressor cells to promote breast cancer progression [J] . Cancer Res, 2021, 81(23): 5919–5934.
- [19] TRAVASSOS L H, CARNEIRO L A M, GIRARDIN S E, et al. Nod1 participates in the innate immune response to *Pseudomonas aeruginosa* [J] . J Biol Chem, 2005, 280(44): 36714–36718.
- [20] CLARKE T B, DAVIS K M, LYSENKO E S, et al. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity [J] . Nat Med, 2010, 16(2): 228–231.
- [21] SINGEL S M, BATTEN K, CORNELIUS C, et al. Receptor-interacting protein kinase 2 promotes triple-negative breast cancer cell migration and invasion *via* activation of nuclear factor- κ B and c-Jun N-terminal kinase pathways [J] . Breast Cancer Res, 2014, 16(2): R28.
- [22] ZARE A, PETROVA A, AGOUMI M, et al. RIPK2: new elements in modulating inflammatory breast cancer pathogenesis [J] . Cancers, 2018, 10(6): 184.
- [23] LIN Y X, XU J X, LAN H Y. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications [J] . J Hematol Oncol, 2019, 12(1): 76.
- [24] SUMAN S, DAS T P, DAMODARAN C. Silencing NOTCH signaling causes growth arrest in both breast cancer stem cells and breast cancer cells [J] . Br J Cancer, 2013, 109(10): 2587–2596.
- [25] MAO L, ZHAO Z L, YU G T, et al. γ -Secretase inhibitor reduces immunosuppressive cells and enhances tumour immunity in head and neck squamous cell carcinoma [J] . Int J Cancer, 2018, 142(5): 999–1009.

(收稿日期: 2025-08-11 修回日期: 2025-10-15)

(责任编辑: 李广涛)