

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.09.004

· 研究快报 ·

IL-6通过诱导SOCS3表达缺失促进乳腺癌MDSCs浸润和免疫抑制活性

程亚楠^a, 蒋蒙蒙^{ab}, 张文文^{ab}, 刘芃芃^a, 张蕊^a, 于津浦^{ab}(天津医科大学肿瘤医院 a. 肿瘤分子诊断中心; b. 免疫学研究室 国家肿瘤临床医学研究中心 天津市肿瘤防治重点实验室 天津市恶性肿瘤临床医学研究中心, 天津 300060)

[摘要] **目的:** 探讨髓系来源抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)通过IL-6诱导STAT3/IDO信号通路活化对T细胞的免疫抑制作用及其分子机制。 **方法:** 收集天津医科大学肿瘤医院2015年11月至2016年2月收治的20例乳腺癌患者肿瘤组织及其癌旁组织和40例健康供者的外周血样本。免疫磁珠技术分选肿瘤组织中的CD33⁺和健康供者外周血中的CD33⁺和CD14⁺细胞, CD33⁺体外与乳腺癌细胞系MDA-MB-231共孵诱导MDSCs生成。流式细胞术检测表型为CD45⁺CD13⁺CD33⁺CD14⁺CD15⁻的MDSCs比例, Western blotting检测细胞因子信号转导抑制因子1(suppressors of cytokine signalling 1, SOCS1)、SOCS3、JAK1、JAK2、TYK2、STAT1、STAT3及其磷酸化水平, qRT-PCR检测IL-6、SOCS1-3的表达水平, CCK-8法检测T细胞增殖情况, Annexin V检测T细胞凋亡, ELISA检测T细胞分泌的IL-10和IFN- γ 。 **结果:** 20例乳腺癌组织中均有不同程度的MDSCs浸润(15.3%~58.1%), 平均为(29.82 \pm 11.46)%; IL-6^{high}组MDSCs浸润比例明显高于IL-6^{low}组[(13.75 \pm 3.44)% vs (4.31 \pm 1.50)%, $P < 0.05$], 且IL-6表达与MDSCs浸润呈正相关($R^2=0.4399$, $P < 0.01$)。体外实验发现肿瘤源性IL-6明显促进体外MDSCs的生成和免疫抑制活性, 该过程可被IL-6信号的阻断所逆转($P < 0.05$); 同样发现在体外诱导的MDSCs中SOCS3表达缺失, 阻断IL-6后, 以上过程被明显抑制($P < 0.05$)。 **结论:** 乳腺癌来源的IL-6刺激MDSCs中JAK/STAT信号通路的持续活化和SOCS3的表达缺失, 进而促进MDSCs的浸润、生成和免疫活性。因此IL-6信号通路可以作为削弱MDSCs生成和逆转MDSCs活性的治疗靶点。

[关键词] 乳腺癌; 髓系来源抑制细胞; 白介素-6; JAK/STAT信号通路; 细胞因子信号转导抑制因子

[中图分类号] R737.9; R392.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)09-0865-07

IL-6 promotes MDSCs infiltration and immunosuppression in breast cancer by inducing SOCS3 deficiency

CHENG Yanan^a, JIANG Mengmeng^{ab}, ZHANG Wenwen^{ab}, LIU Pengpeng^a, ZHANG Rui^a, YU Jinpu^{ab}(a. Cancer Molecular Diagnostics Center; b. Department of Immunology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital National Clinical Research Center for Cancer Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy Clinical Research Center for Malignant Cancer of Tianjin City, Tianjin 300060, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the immunosuppressive effect and underlying molecular mechanisms of Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) on T cells activity through IL-6activatingSTAT3/IDO signaling pathway. **Methods:** Twenty pairs of cancer tissues and the corresponding adjacent normal tissues from breast cancer patients treated at Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital from November 2015 to February 2016 were collected for this study; in the meanwhile, peripheral blood samples from 40 healthy donors were also collected. CD33⁺ cells in tumor tissues and CD33⁺ CD14⁺ cells in peripheral blood of healthy donors were sorted out with MicroBeads technology. CD33⁺ cells were *in vitro* co-cultured with breast cancer cell line MDA-MB-231 to induce MDSCs. Flow cytometry was used to detect the proportion of CD45⁺ CD13⁺CD33⁺CD14⁺CD15⁻ MDSCs. Western Blotting was used to detect the expression ofSOCS1, SOCS3, JAK1, JAK2, TYK2, STAT1, STAT3 and their phosphorylation levels. qRT-PCR was used to detect the expression of IL-6 and SOCS1-3. CCK8 was used to detect the T cell proliferation.

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81472473、81272360); 国家科技支撑计划资助项目(No.2015BAI12B15); 天津市科技计划资助项目(No.13ZCZCSY20300); 天津医科大学肿瘤医院资助项目(No.1407)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No.81472473, No.81272360), the National Science and Technology Pillar Program (No.2015BAI12B15), the Tianjin Municipal Commission of Science and Technology Key Research Program (No.13ZCZCSY20300), and the Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital Research Program (No.1407)

[作者简介] 程亚楠(1987-), 女, 硕士, 研究实习员, 主要从事肿瘤免疫以及肿瘤分子诊断相关的研究, E-mail: yanancheng2700@163.com

[通信作者] 于津浦(YU Jinpu, corresponding author), 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事肿瘤免疫以及肿瘤分子诊断相关的研究, E-mail: yujinpu@tjmuch.com

Annexin V staining was used to detect T cell apoptosis. ELISA was used to detect IL-10 and IFN- γ secreted by T cells. **Results:** There were MDSCs infiltration in all 20 cases of breast cancer tissues for different levels (15.3%~58.1%), with a mean level of (29.82 \pm 11.46%); the infiltration of IL-6^{high} group was significantly higher than that of the IL-6^{low} group [(13.75 \pm 3.44)% vs (4.31 \pm 1.50)%, $P < 0.05$], indicating that IL-6 expression was positively correlated with MDSCs infiltration ($R^2=0.4399$, $P < 0.01$). *In vitro* experiments showed that tumor-derived IL-6 significantly promoted the generation and immunosuppressive activity of MDSCs ($P < 0.05$), which could be reversed by the blocking of IL-6. In the meanwhile, the expression of SOCS3 in MDSCs that induced *in vitro* was absent, which can be inhibited by blocking IL-6 ($P < 0.05$). **Conclusion:** The study has demonstrated that tumor-derived IL-6 stimulates the continuous activation of the JAK/STAT signaling pathway and the absence of SOCS3 expression in MDSCs, thereby promoting the infiltration, generation and immunological activity of MDSCs. Therefore, IL-6 signaling pathway can be used as therapeutic target to weaken MDSCs generation and reverse MDSCs activity.

[Key words] breast cancer; myeloid-derived suppressor cells (MDSCs); IL-6; JAK/STAT signaling pathway; suppressors of cytokine signalling (SOCS)

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(7): 865-871. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.07.004]

免疫抑制细胞髓系来源抑制细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs) 是由多种不成熟髓系来源细胞组成的一群异质性细胞, 在肿瘤微环境中发挥免疫抑制作用, 促进肿瘤的免疫逃逸, 降低了肿瘤的免疫治疗疗效^[1]。在人类和小鼠模型中, MDSCs 的表型不尽相同, 在小鼠中单核细胞样 MDSCs (M-MDSCs) 表型为 CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{hi}, 而在人类中该型 MDSCs 表型为 CD11b⁺HLA-DR^{-lo}CD14⁺CD15⁻; 同样, 在小鼠中多形核细胞样 MDSCs (PMN-MDSCs) 表达 CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{lo}, 人类中该型 MDSCs 表达 CD11b⁺HLA-DR^{-lo}CD14⁻CD15⁺。此外, 在人类中还有另外一种更早期阶段的 MDSCs (e-MDSCs), 表达 Lin⁻HLA-DR⁻CD33⁺^[2]。本课题组^[3]在乳腺癌的研究中也发现了该类 MDSCs, 其表型为 CD45⁺CD33⁺CD13⁺CD14⁻CD15⁻, 能够显著抑制 T 细胞功能, 并且初步了解 MDSC 通过 IL-6 诱导 STAT3/IDO 信号通路活化发挥对 T 细胞的免疫抑制作用^[4], 但 MDSCs 中 IL-6 诱导 STAT3 通路持续激活具体的作用机制尚不明确。正常细胞中 IL-6 介导的 STAT3 活化迅速而短暂, 因正常细胞存在完善的 JAK (janus kinase)/STAT3 通路的细胞因子信号转导抑制因子 (suppressors of cytokine signalling, SOCS) 负反馈机制^[5]。但研究发现多种肿瘤如胆管细胞癌和胃肠肿瘤中存在 STAT3 异常持续活化, 而 SOCS 负反馈障碍是其重要原因^[6]。因此, 本研究旨在探讨 SOCS 负反馈障碍在乳腺癌组织 MDSCs 中 IL-6 诱导 STAT3 通路持续激活的作用及其机制, 探究 IL-6 信号通路作为削弱 MDSCs 生成和逆转 MDSCs 活性的治疗靶点的可能性。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集天津医科大学肿瘤医院 2015 年 11 月至 2016 年 2 月收治的 20 例乳腺癌患者肿瘤组织及其癌

旁组织及 40 例健康供者的外周血样本。20 例乳腺癌患者中位年龄 49 岁, 其中 I 期 8 例、II 期 9 例和 III 期 3 例。纳入标准: 术后病理确诊为浸润性乳腺癌的患者, 可取到癌和癌旁组织; 排除标准: 术后病理确诊为乳腺良性疾病, 不满足纳入标准的患者。40 例健康供者的外周血样本的纳入标准是: 健康人, 无浸润性乳腺癌等肿瘤病史, 可抽取外周血 5 ml; 排除标准: 有浸润性乳腺癌等肿瘤病史, 或无法抽取外周血的供者, 不满足纳入标准的供者。本研究获得了患者的书面知情同意书, 并通过了天津医科大学肿瘤医院医学伦理委员会审查批准。

1.2 细胞系、主要试剂及仪器

乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 由中国医学科学院提供 (3111C0001CCC000014)。CD33、CD14 磁珠购自德国 Miltenyi Biotec 公司, 胎牛血清购自以色列的 Biological Industries 公司, 1640 培养液购自美国 Cellgro 公司, 抗人抗体 CD45、CD13、CD33、CD14、CD15 购自美国 BDBiosciences 公司, CD3 抗体购自美国 BioLegend 公司, IL-6 抗体购自美国 EMD Millipore 公司, 鼠抗人抗体 SOCS1 购自日本 Medical & Biological Laboratories 公司, SOCS3 购自美国 R&D Systems 公司, 兔抗人抗体 JAK1、JAK2、TYK2、STAT1、STAT3、p-STAT1、p-JAK1、p-JAK2、p-TYK2 和 p-STAT3 购自美国 Cell Signaling Technology 公司, 兔二抗购自北京中山金桥生物公司, 检测 T 细胞增殖的 Cell Counting Kit 8 (CCK-8) 试剂盒购自美国 Dojindo Molecular Technologies 公司, 检测 T 细胞凋亡所用的 FITC-Annexin V 和 PI 购自美国 BD Biosciences 公司, ELISA 试剂盒购自深圳市达科为生物技术股份有限公司, SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒购自日本 Takara Bio 公司。酶联免疫测定分析仪为美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品, 流式细胞仪为美国 BDBiosciences 公司产品, 荧光定量仪 ABI 7500 为美国 Applied Biosystems 公司产品。

1.3 免疫磁珠技术分选CD33⁺和CD14⁺细胞及培养

将20例肿瘤组织和癌旁组织分别剪碎成肉糜状,用滤网过滤制备为组织单细胞悬液。使用CD33磁珠分选CD33⁺细胞,余下阴选的细胞用于IL-6的表达检测。收集40例健康供者的外周血用于单核细胞的分离。使用CD33磁珠和CD14磁珠分选CD33⁺细胞和CD14⁺细胞,用锥虫蓝染色计数活率。乳腺癌细胞系MDA-MB-231用含10%胎牛血清的1640培养液培养细胞,置37℃、5%CO₂孵箱培养。从健康供者外周血单核细胞中分选出CD33⁺细胞,与乳腺癌细胞系MDA-MB-231共培养。

1.4 流式细胞术检测肿瘤和癌旁组织细胞表面标志物的表达

从乳腺癌组织中分离出原位MDSCs,评估CD45⁺CD33⁺CD13⁺CD14⁺CD15⁺MDSCs的比例。PerCP-Cy5标记的抗人CD45、PE标记的抗人CD13和CD33、FITC标记的抗人CD14和CD15用于标记MDSCs,同时标记同型对照。与抗体孵育30 min后,清洗细胞并重悬,通过流式细胞仪检测细胞表面标志物的表达。MDSCs比例的检测首先使用CD45圈门,其中CD33⁺CD13⁺CD14⁺CD15⁺细胞群所占比例即为MDSCs比例。

1.5 流式细胞术检测表型为CD45⁺CD13⁺CD33⁺CD14⁺CD15⁺的MDSCs细胞比例

从健康供者外周血单核细胞中分选出CD33⁺细胞(2×10⁶/ml)体外与乳腺癌细胞系MDA-MB-231以5:1比例共培养,加或不加IL-6抗体,分别体外诱导MDSCs和IL-6抗体处理的MDSCs生成。CD33⁺细胞用含10%胎牛血清的1640培养液培养用作阴性对照,培养48 h后分别收获MDSCs用于进一步分析。再次流式细胞术检测表型为CD45⁺CD13⁺CD33⁺CD14⁺CD15⁺MDSCs的细胞比例。

1.6 CCK-8法检测T细胞增殖率

使用CCK-8试剂盒检测T细胞或T细胞与MDSCs共同培养后的增殖情况。使用Human Pan T cell Isolation Kit II试剂盒从健康供者的单核细胞中分离出CD3⁺T细胞。有95%以上存活率的MDSCs和T细胞用于功能性分析。将纯化的T细胞(2×10⁵)接种在96孔板上,并与CD33⁺细胞或MDSCs或IL-6抗体处理的MDSCs共同培养(T细胞/CD33⁺细胞或MDSCs=1:3,3个复孔)。细胞在完全培养基中培养,添加抗CD3/CD28抗体,置37℃、5%CO₂孵箱培养3 d。每个培养孔按10 μl/100 μl加入CCK-8试剂;没有细胞的空白孔为阴性对照,用抗CD3/CD28抗体刺激的T细胞作为T细胞对照。经过4 h的孵育,使用酶联免疫测定分析仪测定450 nm的光密度(D)值。使用增

殖指数(SI)计算细胞增殖,SI(%)= $D_{\text{实验组}}/(D_{\text{单独T细胞}}+D_{\text{单独CD33+或MDSCs}}) \times 100\%$ 。

1.7 流式细胞术检测T细胞凋亡率

将纯化的T细胞(5×10⁵)接种在24孔板上,并与CD33⁺细胞或MDSCs或IL-6抗体处理的MDSCs共同培养(T细胞/CD33⁺细胞或MDSCs=1:3)。细胞在完全培养基中培养,添加CD3/CD28抗体(磁珠/细胞比1:1),置37℃、5%CO₂孵箱培养3 d。使用Annexin V Assay进行T细胞凋亡检测。根据SSC和FSC圈门淋巴细胞,然后使用APC标记CD3抗体圈门T细胞。使用FITC-Annexin V和PI(BD Biosciences, USA)染色细胞,Annexin V表达阳性和PI表达阴性代表凋亡的T细胞。

1.8 ELISA法检测T细胞分泌的IL-10和IFN-γ水平

按照1.7方法收集细胞培养上清液,按照ELISA试剂盒说明书操作检测IL-10和IFN-γ。

1.9 qRT-PCR检测乳腺癌组织IL-6、SOCS1~3的表达水平

使用qRT-PCR检测乳腺癌组织分离的MDSCs和体外诱导的MDSCs中SOCS1、SOCS2和SOCS3的mRNA表达及乳腺癌组织IL-6的表达。使用 $2^{-\Delta Ct}$ ($\Delta Ct=Ct_{\text{target gene}}-Ct_{\beta\text{-actin}}$)计算表达量。实验重复3次。

1.10 Western blotting检测SOCS1、SOCS3、JAK1~2、TYK2、STAT1、STAT3蛋白含量及其磷酸化水平

配制10%分离胶和5%浓缩胶,取30 μg蛋白进行SDS-PAGE,湿转至PVDF膜上。使用鼠抗人抗体检测SOCS1、SOCS3和β-actin;兔抗人抗体检测JAK1~2、TYK2、STAT1、STAT3、p-STAT1、p-JAK1~2、p-TYK2和p-STAT3。一抗孵育PVDF膜4℃过夜,再加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的鼠或兔二抗,用SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate kit显影,使用Quantity One软件,通过比较目的蛋白质带的密度与β-actin蛋白带的密度确定蛋白的相对定量。使用磷酸化蛋白与总蛋白表达的比值确定磷酸化蛋白的表达。

1.11 统计处理

采用SPSS 19.0统计学软件。计数资料以百分率(%)表示,组间比较采用χ²检验;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析,相关性比较采用Spearman检验。以P<0.05或P<0.01表示差异有统计学意义。

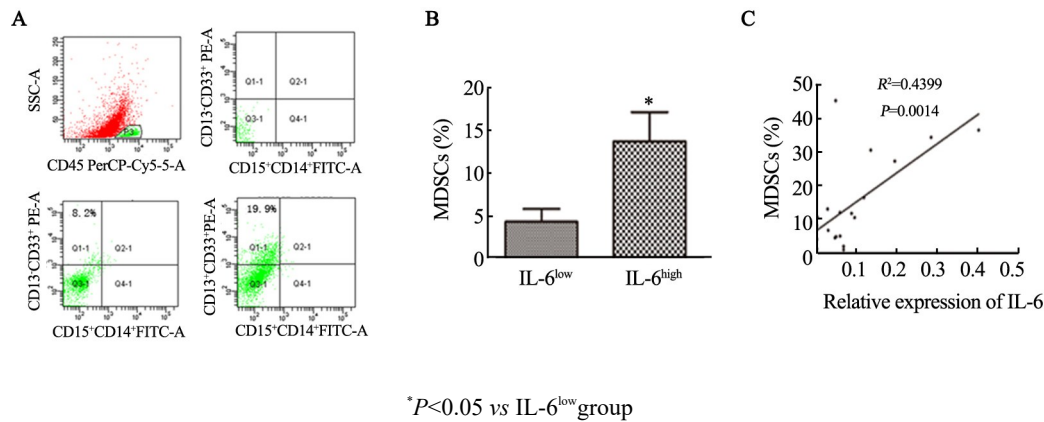
2 结果

2.1 肿瘤源性IL-6表达与MDSCs浸润呈正相关

流式细胞术检测CD45⁺CD33⁺CD13⁺CD14⁺CD15⁺MDSCs细胞比例,结果(图1A)显示,20例乳腺癌组

组织中均有不同程度的MDSCs浸润(15.3%~58.1%),平均浸润比例为(29.82±11.46)%。以IL-6相对表达量的中位数为界将20例乳腺癌分为IL-6高表达组(IL-6^{high})和IL-6低表达组(IL-6^{low});结果(图1B)显

示,IL-6^{high}组MDSCs浸润比例明显高于IL-6^{low}组[(13.75±3.44)% vs (4.31±1.50)% $P<0.05$]。相关性分析结果(图1C)显示IL-6表达与MDSCs浸润呈正相关($R^2=0.4399, P<0.01$)。



A: The proportion of MDSCs infiltration; B: The proportion of MDSCs infiltration in IL-6^{high} group and IL-6^{low} group; C: Correlation analysis of IL-6 expression with MDSCs infiltration

图1 肿瘤源性IL-6与乳腺癌原位组织中浸润的MDSCs的关系

Fig.1 The relationship between tumor derived IL-6 and the MDSCs infiltration in breast cancer tissues

2.2 IL-6可以促进体外诱导的乳腺癌细胞MDSCs生成

流式细胞术检测细胞表型结果(图2)显示,对照组表型为CD45⁺CD13⁺CD33⁺CD14⁺CD15⁺的MDSCs比例为(7.20±1.11)%,而乳腺癌细胞诱导的MDSCs比例提高到(30.83±1.59)%($P<0.01$),加入IL-6中和抗体后,MDSCs的比例下降至(11.98±3.5)%($P<0.01$)。

2.3 IL-6促进MDSCs显著抑制T细胞的免疫活性

CCK-8法检测T细胞增殖结果(图3A)显示,与CD33⁺对照组对比,MDSCs显著地抑制了实验组T细胞的增殖(1.01±0.16 vs 1.84±0.23, $P<0.05$);阻断IL-6后,MDSCs对T细胞增殖的抑制作用被逆转(1.71±0.17 vs 1.01±0.16, $P<0.05$)。流式细胞术检测T细胞凋亡(图3B)结果显示,与CD33⁺对照组相比,MDSCs促进实验组T细胞凋亡[(19.17±2.12)% vs (10.28±1.26)% $P<0.05$],阻断IL-6信号可逆转该免疫抑制功能[(9.79±0.64)% vs (19.20±2.13)% $P<0.05$]。ELISA检测结果(图3C)显示,MDSCs促进IL-10分泌[(509.80±52.25 vs 345.41±35.68)pg/ml, $P<0.05$],抑制IFN- γ 分泌[(1094.0±113.4) vs 602.0±120.5)pg/ml, $P<0.05$],阻断IL-6后,以上作用被逆转。表明MDSCs对T细胞发挥免疫抑制活性是IL-6依赖性的,阻断IL-6信号可以逆转MDSCs的抑制活性。

2.4 IL-6体外诱导乳腺癌MDSCs激活JAK/STAT信号通路

Western blotting检测结果(图4)显示,与CD33⁺对

照组相比,MDSCs中JAK1、JAK2、TYK2、STAT1和STAT3蛋白表现为高磷酸化状态。阻断IL-6之后降低了JAK1、JAK2、TYK2、STAT1和STAT3磷酸化水平。

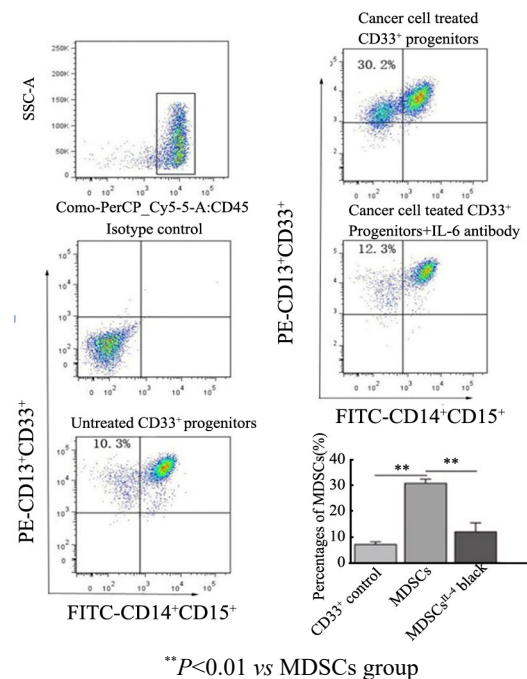


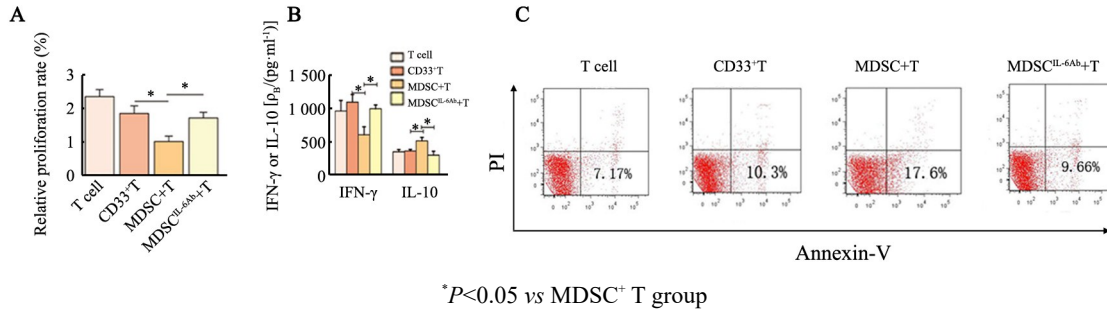
图2 IL-6对体外诱导的乳腺癌MDSCs生成的影响
Fig.2 Effects of IL-6 on the generation of breast cancer MDSCs that induced in vitro

2.5 IL-6诱导乳腺癌组织MDSCs中SOCS的表达障碍

qRT-PCR检测结果(图5A)显示,MDSCs中SOCS1表达较CD33⁺和CD14⁺明显升高,SOCS3表达

降低(均 $P < 0.01$), SOCS2在3组细胞中均未检测到。且 IL-6^{high}组 SOCS1 表达高于 IL-6^{low}组 ($P < 0.05$), 而 IL-6^{high}组 SOCS3 表达低于 IL-6^{low}组 ($P < 0.01$)。见图

5B。表明乳腺癌MDSCs中存在SOCS3负反馈失调, 且IL-6诱导SOCS3表达障碍。



A: The effect of MDSCs on the proliferation of T cells; B: The effect of IL-6+MDSCs on the cytokine secretion of T cells by ELISA; C: The effect of IL-6+MDSCs on the apoptosis of T cells by FCM

图3 IL-6对乳腺癌MDSCs免疫抑制活性的影响

Fig.3 Effect of IL-6 on immunosuppressive activity of MDSCs in breast cancer

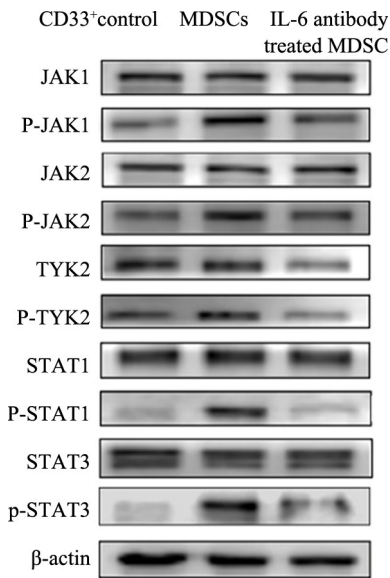


图4 IL-6对体外诱导乳腺癌MDSCs中JAK/STAT信号通路的影响

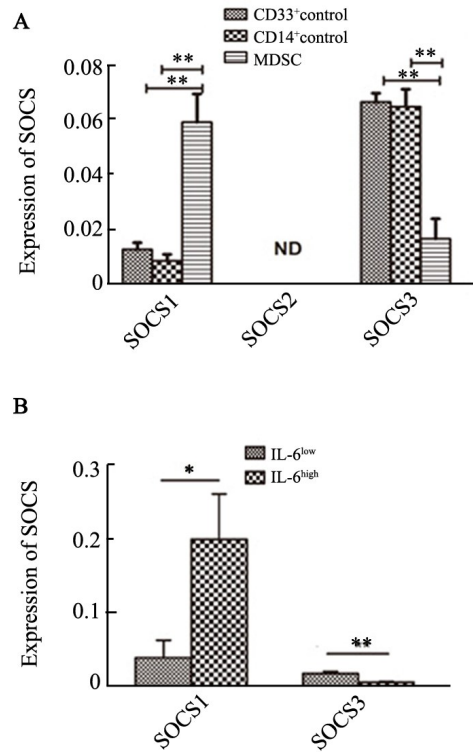
Fig. 4 Effect of IL-6 on the JAK/STAT signaling pathway in breast cancer MDSCs that induced *in vitro*

2.6 体外诱导的乳腺癌MDSCs中SOCS表达

qRT-PCR检测结果(图6A)显示,在体外诱导MDSCs后,SOCS1 mRNA表达水平升高,SOCS3 mRNA表达降低(均 $P < 0.05$);阻断IL-6后,SOCS1 mRNA表达降低,SOCS3 mRNA表达升高(均 $P < 0.05$)。Western blotting检测结果(图6B)显示,在蛋白水平上,阻断IL-6后,仅SOCS3表达升高($P < 0.05$),而SOCS1无明显变化($P > 0.05$)。

3 讨论

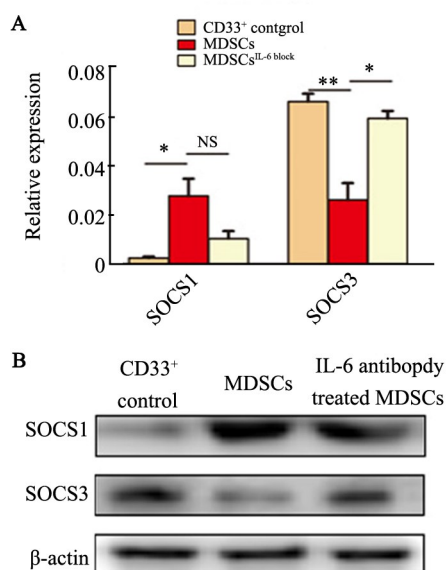
MDSCs是肿瘤微环境中主要的一群免疫调节性细胞,削弱了抗肿瘤的先天性和适应性免疫反应。



* $P < 0.05$ vs IL-6^{low} group; ** $P < 0.01$ vs IL-6^{low} or MDSCs group

A: The expression of SOCS1-3 in MDSCs; B: The expression of SOCS1 in IL-6^{high} group was higher than that in IL-6^{low} group, while the expression of SOCS3 in IL-6^{high} group was lower than that in IL-6^{low} group

图5 原位乳腺癌组织MDSCs中SOCS的表达
Fig.5 Expression of SOCS in MDSCs of *in situ* breast cancer tissues



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs MDSCs group

图6 体外诱导的乳腺癌MDSCs中SOCS1 and SOCS3 mRNA (A)和蛋白(B)的表达水平

Fig. 6 The expression of SOCS1 and SOCS3 mRNA (A) and protein (B) in MDSCs that induced *in vitro*

MDSCs在正常人体中数量极少,但在肿瘤患者的外周血、肿瘤周围、脾脏、骨髓及淋巴结等组织中MDSCs明显增加。而间质细胞及肿瘤细胞分泌的细胞因子会促进MDSCs的扩增、迁移^[7]。文献^[1,8-9]报道,多种细胞因子如IL-1 β 、IL-6、IL-4、GM-CSF等可以诱导MDSCs在肿瘤组织中募集,提高MDSCs免疫活性,在这些肿瘤来源的细胞因子中,IL-6被认为是MDSCs的有效诱导因素。有研究^[10]显示,IL-6诱导前列腺肿瘤MDSCs产生,而抑制IL-6可减少荷瘤小鼠体内MDSCs生成。本课题组^[3]前期研究中也发现,IL-6促进体外诱导的乳腺癌MDSCs生成。在本研究中,发现在乳腺癌原位组织中,IL-6促进MDSCs浸润,且IL-6表达与MDSCs浸润数呈正相关关系。为了进一步探讨IL-6对MDSCs的作用,在体外实验中,阻断IL-6信号通路后,检测发现MDSCs生成减少,亦证明了IL-6可促进MDSCs生成。MDSCs可以通过调控肿瘤微环境中的免疫细胞,如T细胞、DC和Tregs等,从而促进肿瘤进展。在这些免疫细胞中,MDSCs尤其对T细胞发挥至关重要的作用。一项乳腺癌研究^[11]证明,MDSCs通过促进T细胞向促肿瘤作用的Th2型细胞分化,提高免疫抑制作用,产生免疫耐受,促进肿瘤进展。同样,本课题组前期研究也发现,MDSCs抑制T细胞增殖、促进T细胞凋亡、抑制Th1类细胞因子(IFN- γ)分泌、促进Th2类细胞因子(IL-10)分泌。在本研究中,进一步发现阻断IL-6

后逆转了MDSCs对T细胞的免疫抑制作用,表明MDSCs对T细胞功能的发挥是IL-6依赖性的。

在细胞信号转导过程中,IL-6和IL-6R相互作用激活JAK/STAT信号通路,调控下游基因的表达。过度活化的STAT3可通过Bcl-xL、c-myc和细胞周期蛋白D1等途径抑制幼稚髓源性细胞分化成熟^[12-13]。本课题组^[3-4]前期研究显示,乳腺癌组织MDSCs中存在STAT3持续活化,活化的STAT3通过非经典NF- κ B途径介导的IDO过表达是乳腺癌MDSCs实现免疫抑制功能的重要分子机制之一。前期体外诱导实验^[4]证明,外源性IL-6因子刺激可诱导乳腺癌组织MDSCs中IDO上调。在本研究中,同样发现MDSCs中存在JAK/STAT信号通路的活化,表现为JAK1、JAK2、TYK2、STAT1、STAT3磷酸化水平升高,并且阻断IL-6后,JAK/STAT通路活性降低,提示JAK/STAT通路异常激活是影响乳腺癌MDSCs生成和功能的关键调控因素,并且肿瘤源性IL-6在激活JAK/STAT信号通路中发挥至关重要的作用。

在正常细胞中,STAT蛋白表现为快速性和可逆性激活,而在肿瘤细胞中,STAT蛋白的磷酸化在很长一段时间内是持续的^[14-15]。JAK/STAT信号通路的负反馈障碍导致STAT蛋白的持续激活、肿瘤形成、肿瘤侵袭和转移^[5]。其中SOCSs是负反馈调控JAK/STAT通路的主要蛋白,尤其是SOCS1-SOCS3。它们直接抑制JAKs的酶活性,从而阻断了细胞因子诱导的胞内信号转导链的传递,而JAKs是IL-6传递信号必须经过的信号分子。而基因敲除实验显示,SOCS1在体外抑制IL-6的生物学效应中作用不大^[16],生理状态下真正抑制IL-6生物学效应的SOCS家族成员为SOCS3^[17]。

在正常机体中,STAT3诱导SOCS3表达,SOCS3反过来抑制JAK/STAT3信号转导,形成一个负反馈环,从而使被激活的STAT3迅速恢复基础状态。因此完整的SOCS3负反馈抑制环是确保JAK/STAT3信号活化处于正常水平的主要机制。多项针对肿瘤细胞自身的研究显示,SOCS3缺陷是导致人类肿瘤细胞中IL-6/STAT3信号持续活化的原因。然而,针对SOCS3在免疫细胞中表达的相关研究却比较少。有研究指出,SOCS3调控CD4⁺T细胞的活化,促进其向Th2型细胞分化^[18];SOCS3调控DCs的活化和巨噬细胞的极化^[5,19-20]。而SOCS在MDSCs中的研究却很少见,最近一项关于前列腺癌的研究指出,SOCS3通过抑制STAT3活化调控MDSCs的发展和功能^[21]。在本研究中,在乳腺癌原位组织和体外诱导实验中均发现MDSCs中存在SOCS3表达缺失,而阻断IL-6则恢复了SOCS3的表达,同时抑制了JAK/STAT信号通路

的活化,这说明IL-6可以通过诱导SOCS3表达缺失,导致其负反馈发生障碍,进而促进JAK/STAT信号通路持续活化和下游信号蛋白的过表达,如IDO、NF- κ B等,最终促进MDSCs扩增,提高MDSCs免疫抑制功能。因此,笔者首次提出了引起MDSCs的IL-6/JAK/STAT信号通路活化的具体分子机制。

因此,通过阻断IL-6信号通路,恢复SOCS3的负反馈抑制功能,抑制JAK/STAT信号活化,从而减少MDSCs生成和抑制MDSCs免疫活性,可以作为治疗乳腺癌的一个潜在靶点,也为探讨调控MDSCs的分子机制提供了新的研究方向。

[参考文献]

- [1] WEN D S. Suppressive role of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in the microenvironment of breast cancer and targeted immunotherapies[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(39): 64505-64511. DOI: 10.18632/oncotarget.11352.
- [2] BRONTE V, BRANDAU S, CHEN S H, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards[J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(9): 2046-2054. DOI: 10.1111/jcmm.13124.
- [3] YU J, DU W, YAN F, et al. Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer[J]. *J Immunol*, 2013, 190(7): 3783-3797. DOI: 10.4049/jimmunol.1201449.
- [4] YU J, WANG Y, YAN F, et al. Noncanonical NF-kappaB activation mediates STAT3-stimulated IDO upregulation in myeloid-derived suppressor cells in breast cancer[J]. *J Immunol*, 2014, 193(5): 2574-2586. DOI:10.4049/jimmunol.1400833.
- [5] JIANG M, ZHANG W W, LIU P, et al. Dysregulation of SOCS-mediated negative feedback of cytokine signaling in carcinogenesis and its significance in cancer treatment[J]. *Front Immunol*, 2017, 8(1): 70-77. DOI:10.3389/fimmu.2017.00070.
- [6] ISOMOTOH M J, KOBAYASHISET A L. Sustained IL-6/STAT-3 signaling in cholangiocarcinoma cells due to SOCS-3 epigenetic silencing[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(1): 384-396. DOI:10.1053/j.gastro.2006.10.037
- [7] SOLITO S, PINTON L, MANDRUZZATO S. In brief: myeloid-derived suppressor cells in cancer[J]. *J Pathol*, 2017, 242(1): 7-9. DOI: 10.1002/path.4876.
- [8] YANG G, SHEN W, ZHANG Y, et al. Accumulation of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) induced by low levels of IL-6 correlates with poor prognosis in bladder cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(24): 38378-38388. DOI:10.18632/oncotarget.16386.
- [9] LIN Y, YANG X, LIU W, et al. Chemerin has a protective role in hepatocellular carcinoma by inhibiting the expression of IL-6 and GM-CSF and MDSC accumulation[J]. *Oncogene*, 2017, 36(25): 3599-3608. DOI:10.1038/ncr.2016.516.
- [10] WU C T, HSIEH C C, LIN C C, et al. Significance of IL-6 in the transition of hormone-resistant prostate cancer and the induction of myeloid-derived suppressor cells[J]. *J Mol Med*, 2012, 90(11): 1343-1355. DOI:10.1007/s00109-012-0916-x.
- [11] GONDA K, SHIBATA M, OHTAKE T, et al. Myeloid-derived suppressor cells are increased and correlated with type 2 immune responses, malnutrition, inflammation, and poor prognosis in patients with breast cancer[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(2): 1766-1774. DOI:10.3892/ol.2017.6305.
- [12] NEFEDOVA Y, NAGARAJ S, ROSENBAUER A, et al. Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic-selective inhibition of the janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(20): 9525-9535. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-05-0529.
- [13] NEFEDOVA Y, HUANG M, KUSMARTSEV S, et al. Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer[J]. *J Immunol*, 2004, 172(1): 464-474. DOI: https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.1.464.
- [14] BABON J J, VARGHESE L N, NICOLA N A. Inhibition of IL-6 family cytokines by SOCS3[J]. *Semin Immunol*, 2014, 26(1): 13-19. DOI:10.1016/j.smim.2013.12.004.
- [15] LEE M, RHEE I. Cytokine signaling in tumor progression[J]. *Immune Network*, 2017, 17(4): 214. DOI:10.4110/in.2017.17.4.214.
- [16] ALEXANDER W S, STARR R, FENNER J E, et al. SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine[J]. *Cell*, 1999, 98(5): 597-608. DOI :10.1016/S0092-8674(00)80047-1.
- [17] CROKER B A, KIU H, PELLEGRINI M, et al. IL-6 promotes acute and chronic inflammatory disease in the absence of SOCS3[J]. *Immunol Cell Biol*, 2012, 90(1): 124-129. DOI:10.1038/icb.2011.29.
- [18] EGWUAGU C E, YU C R, ZHANG M, et al. Suppressors of cytokine signaling proteins are differentially expressed in Th1 and Th2 cells: implications for Th cell lineage commitment and maintenance [J]. *J Immunol*, 2002, 168(7): 3181-3187. DOI: 10.4049/jimmunol.168.7.3181.
- [19] YU J, SUN J, WANG S E, et al. Upregulated expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase in primary breast cancer correlates with increase of infiltrated regulatory T cells in situ and lymph node metastasis[J/OL]. *Clin Dev Immunol*, 2011, 2011:469135[2018-03-11]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3202140/. DOI: 10.1155/2011/469135.
- [20] JACKSON S H, YU C R, MAHDI R M, et al. Dendritic cell maturation requires STAT1 and is under feedback regulation by suppressors of cytokine signaling[J]. *J Immunol*, 2004, 172(4): 2307-2315. DOI:10.4049/jimmunol.172.4.2307.
- [21] YU H, LIU Y, MCFARLAND B C, et al. SOCS3 deficiency in myeloid cells promotes tumor development: involvement of STAT3 activation and myeloid-derived suppressor cells[J]. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3(7): 727-740. DOI:10.1158/2326-6066.CIR-15-0004.

[收稿日期] 2018-06-18

[修回日期] 2018-08-11

[本文编辑] 王映红