

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.08.007

· 临床研究 ·

白细胞介素-37抑制乳腺癌患者外周血和肿瘤微环境中CD8⁺T细胞的杀伤功能

郑鹏飞,董良鹏,高延鑫,张一夫,秦双(新乡医学院第一附属医院 甲状腺乳腺外科,河南 卫辉 453100)

[摘要] **目的:**观察白细胞介素-37(IL-37)在乳腺癌患者的表达变化对CD8⁺T细胞活性的影响。**方法:**纳入2020年7月至2022年9月在新乡医学院第一附属医院就诊的46例乳腺癌患者、24例乳腺良性肿瘤患者、20例对照者。采集外周血,分离血浆和外周血单个核细胞(PBMC),收集接受手术治疗的乳腺癌患者肿瘤组织和癌旁组织,分离组织中肿瘤浸润淋巴细胞(TILs),纯化CD8⁺T细胞。ELISA法检测IL-37、可溶性单免疫球蛋白IL-1受体相关蛋白(SIGIRR)表达,实时定量PCR法检测组织中IL-37 mRNA,流式细胞术检测CD8⁺T细胞中IL-18受体 α 链(IL-18R α)和SIGIRR表达。外源性IL-37刺激纯化的CD8⁺T细胞,与乳腺癌细胞系MCF-7共培养,通过测定乳酸脱氢酶水平计算靶细胞死亡比例,ELISA法检测上清中穿孔素、颗粒酶B、干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平。**结果:**乳腺癌患者血浆IL-37水平高于乳腺良性肿瘤患者[(554.17 \pm 96.63)pg/mL vs (499.52 \pm 78.66)pg/mL, $P=0.020$]和对照者[(483.97 \pm 47.23)pg/mL, $P=0.003$]。乳腺癌患者肿瘤组织中IL-37 mRNA相对表达量高于癌旁组织[(1.88 \pm 0.21) vs (1.00 \pm 0.53)pg/mL, $P<0.001$]。外周血IL-18R α ⁺CD8⁺细胞比例、SIGIRR⁺CD8⁺细胞比例、血浆可溶性SIGIRR水平在乳腺癌患者、乳腺良性肿瘤患者、对照者之间的差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。CD8⁺TILs表达IL-18R α 和SIGIRR的比例在肿瘤组织和癌旁组织之间的差异无统计学意义($P>0.05$)。重组人IL-37刺激后,CD8⁺T细胞诱导靶细胞死亡比例、上清中IFN- γ 和TNF- α 水平在直接接触和间接接触共培养系统中均低于无刺激(均 $P<0.05$)。在直接接触共培养系统中,IL-37刺激后上清中穿孔素和颗粒酶B水平均低于无刺激(均 $P<0.001$),但在间接接触共培养系统中,上清中穿孔素和颗粒酶B水平在无刺激和IL-37刺激之间的差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。**结论:**乳腺癌患者中IL-37水平升高可能参与诱导外周血和肿瘤微环境中CD8⁺T细胞功能衰竭。

[关键词] 乳腺肿瘤;白细胞介素-37;CD8阳性T淋巴细胞;肿瘤微环境

[中图分类号] R737.9;R730.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025)08-0839-08

Interleukin-37 suppresses the cytotoxicity of CD8⁺T cells in the peripheral blood and tumor microenvironments in breast cancer patients

ZHENG Pengfei, DONG Liangpeng, GAO Yanxin, ZHANG Yifu, QIN Shuang (Department of Thyroid and Breast Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui, 453100, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of changes in interleukin-37 (IL-37) expression on CD8⁺T cell vitality in patients with breast cancers. **Methods:** Forty-six patients with breast cancers, twenty-four patients with benign breast tumors, and twenty controls enrolled at the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University between July 2020 and September 2022 were included in the study. Peripheral blood was collected. Plasma and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated. Tumor tissues and para-cancerous tissues were collected from breast cancer patients who received surgical treatment. Tumor infiltrating lymphocytes (TILs) were isolated and CD8⁺T cells purified. IL-37 and the expressions of soluble single immunoglobulin IL-1 receptor-related (SIGIRR) proteins were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). IL-37 mRNA in the tissue was measured by real-time PCR. IL-18 receptor α chain (IL-18R α) and SIGIRR expression in CD8⁺T cells were measured by flow cytometry. Purified CD8⁺T cells were stimulated with exogenous IL-37, and were co-cultured with breast cancer cell line MCF-7. The percentage of target cell death was calculated by measuring the level of lactate dehydrogenase. Perforin, granzyme B, interferon- γ (IFN- γ), and the level of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the supernatants was detected by ELISA. **Results:** Plasma IL-37 level was significantly elevated in patients with breast cancer compared with that in patients with benign breast tumors [(554.17 \pm 96.63) vs [499.52 \pm 78.66] pg/mL, $P=0.020$) and that in the controls [(483.97 \pm 47.23) pg/mL, $P=0.003$]. The expression of IL-37 mRNA in the tumor tissues was higher

[基金项目] 新乡科技攻关项目(No. GG2020031)

[作者简介] 郑鹏飞(1987—)男,硕士,主治医师,主要从事甲状腺及乳腺肿瘤的诊治研究

[通信作者] 秦双(扫码获取作者联系方式)



than that in the para-cancerous tissues in patients with breast cancer ($[1.88 \pm 0.21]$ vs $[1.00 \pm 0.53]$ pg/mL, $P < 0.001$). There were no statistically significant differences of peripheral IL-18R α^+ CD8 $^+$ cell percentage, SIGIRR $^+$ CD8 $^+$ cell percentage, or the level of soluble SIGIRR among patients with breast cancer, patients with benign breast tumors, and the controls ($P > 0.05$). There were also no statistically significant differences of the percentages of IL-18R α^+ or SIGIRR $^+$ expression in CD8 $^+$ TIL cells between the tumor tissues and the para-cancerous tissues ($P > 0.05$). The percentage of CD8 $^+$ T cell-induced target cell death, and the levels of IFN- γ and TNF- α in the supernatants in both direct contact and indirect contact co-culture systems were reduced with IL-37 stimulation compared with those without IL-37 stimulation ($P < 0.05$). In direct contact co-culture system, the levels of perforin and granzyme B in the supernatants were down-regulated in response to IL-37 stimulation compared with those without stimulation ($P < 0.001$). However, in indirect contact co-culture system there were no significant differences in the levels of perforin or granzyme B in the supernatants with or without IL-37 stimulation ($P > 0.05$). **Conclusion:** Elevated IL-37 level might take part in the induction of CD8 $^+$ T cell exhaustion in peripheral blood and tumor microenvironments in breast cancer patients.

[Key words] breast neoplasia; interleukin-37 (IL-37); CD8 $^+$ T-lymphocytes (CD8 $^+$ T cell); tumor microenvironment

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(8): 839-846. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.08.007]

乳腺癌严重威胁女性健康。根据美国癌症统计数据,2023年美国新发乳腺癌病例超过30万,死亡病例约4.4万^[1]。中国2020年新发乳腺癌病例达42万,居中国女性癌症新发病例首位,占全部女性恶性肿瘤的19.9%^[2]。随着医疗条件和诊疗手段的不断进步,中国乳腺癌患者5年生存率不断升高,已接近83%,但仍有20%~30%的患者会进展为晚期乳腺癌^[2]。恶性肿瘤患者中存在CD8 $^+$ T细胞功能衰竭,导致CD8 $^+$ T细胞无法有效发挥杀伤肿瘤细胞的作用,进而造成免疫耐受和肿瘤进展^[3-4]。本课题组既往研究^[5]也发现,乳腺癌患者中存在CD8 $^+$ T细胞功能衰竭,该过程参与乳腺癌发病,但乳腺癌患者CD8 $^+$ T细胞功能的调控机制仍有待进一步研究。白细胞介素-37(IL-37)属于IL-1细胞因子家族成员,其受体是由IL-18受体 α 链(IL-18 receptor α chain, IL-18R α)和单免疫球蛋白IL-1受体相关蛋白(single immunoglobulin IL-1 receptor-related protein, SIGIRR)组成的异源二聚体^[6]。IL-37介导的信号通路可导致促炎基因表达下调,细胞因子表达受抑制^[7]。因此,IL-37在肿瘤、自身免疫性疾病、感染性疾病中通过抑制炎症介质表达同时抑制固有免疫和适应性免疫应答,发挥免疫抑制活性^[8]。IL-37可通过SIGIRR介导的信号通路诱导CD8 $^+$ T细胞功能衰竭,导致结肠癌小鼠模型中CD8 $^+$ T细胞不能有效发挥免疫保护作用^[9]。但IL-37在乳腺癌患者中对CD8 $^+$ T细胞功能的调控研究较少。因此,本研究观察了IL-37在乳腺癌患者的表达变化,利用体外细胞培养系统,探讨重组人IL-37对乳腺癌患者CD8 $^+$ T细胞功能的影响。

1 材料与方法

1.1 研究对象

研究方案由新乡医学院第一附属医院伦理委员会审批(EC-023-117)。所有受试者均签署知情同意书。研究对象为2020年7月至2022年9月于本院就

诊的患者。纳入标准:(1)年龄18~70岁;(2)签署知情同意书;(3)乳腺癌患者经病理学诊断为浸润性导管癌,乳腺良性肿瘤患者经病理学诊断为良性增生性病变;(4)初治患者,未接受过手术、放疗、化疗、免疫及靶向等治疗。排除标准:(1)合并其他组织来源的恶性肿瘤;(2)合并肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒等慢性病毒感染;(3)合并中枢神经系统、心、肺、肝、肾等重要器官功能衰竭;(4)妊娠或哺乳期女性。合并其他组织来源的恶性肿瘤、慢性病毒感染、严重器官功能衰竭等患者均被排除。

乳腺癌组:共46例,均为女性,年龄(54.29 ± 13.13)岁(27~69岁,中位年龄51岁),I~II级28例,III级18例。乳腺良性肿瘤组:24例,均为女性,年龄(41.98 ± 7.13)岁(24~51岁,中位年龄43岁)。对照组:20例健康体检者,均为女性,年龄(44.33 ± 8.86)岁(27~61岁,中位年龄44岁)。

1.2 主要仪器和试剂

微孔板读数仪购自美国伯乐公司,LightCycler实时定量PCR仪购自瑞士罗氏公司,FACSCalibur流式细胞仪购自美国BD公司,Transwell培养板购自美国康宁公司,Percoll细胞分离液购自美国GE Healthcare公司,人淋巴细胞分离液(Ficoll)购自美国Sigma公司,CD8 $^+$ T细胞纯化试剂盒购自德国美天旎公司,重组人IL-37购自美国Pepro Tech公司,酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒[检测指标:IL-37、可溶性SIGIRR、穿孔素、颗粒酶B、干扰素- γ (IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)]购自武汉华美生物公司,TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司,反转录试剂盒和实时荧光定量PCR试剂盒购自瑞士罗氏公司,抗体试剂:小鼠抗人CD3-PerCP Cy5.5(克隆编号SK7)、小鼠抗人CD8-FITC(克隆编号HIT8a)、小鼠抗人-IL-18R α -PE(克隆编号H44)均购自美国BD公司,兔抗人-SIGIRR-APC克隆编号EPR22438-93购自美国Abcam公司,

乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测试剂盒购自武汉碧云天公司。

1.3 血浆和外周血单个核细胞(PBMC)分离

采集乳腺癌组、乳腺良性肿瘤组及对照组受试者的乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝静脉血20 mL,离心分离血浆后,采用密度梯度离心法分离PBMC。

1.4 乳腺癌和癌旁组织中肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)分离

术中采集27例接受手术治疗的乳腺癌患者的肿瘤组织及配对癌旁组织。将组织切碎,置于5 mL RPMI 1640培养液中,在无菌培养皿内将组织碾碎,使用70目滤网过滤,收集细胞悬液。向细胞悬液中加入胶原酶(0.5 mg/mL)、DNase I (0.000 1%),于37 °C孵育30 min,期间间歇轻柔混匀以充分消化胶原。向细胞悬液中加入40 mL预冷的RPMI 1640终止消化,50 × g离心2 min,弃上清液,收集细胞沉淀,用3 mL含有44% Percoll分离液的RPMI 1640重悬细胞,将细胞悬液沿管壁缓慢加入5 mL含有56% Percoll分离液的PBS溶液上层,850 × g离心30 min(缓升缓降法),收集中央白膜层,内含纯化的TIL。

1.5 CD8⁺T细胞的纯化

从12例HLA-A*02限制性乳腺癌患者PBMC和TIL中纯化CD8⁺T细胞。离心收集细胞沉淀,加入40 μL纯化缓冲液重悬细胞,然后加入10 μL生物素标记的抗体混合物(包含抗CD4、抗CD14、抗CD15、抗CD16、抗CD19、抗CD36、抗CD56、抗CD123、抗TCRγ/δ、抗CD235),于4 °C反应5 min,加入30 μL纯化缓冲液,然后加入20 μL CD8⁺T细胞分选磁珠复合物,于4 °C反应10 min。将分离柱置于磁力分离架的分选区,加入细胞悬液,收集穿过分离柱的纯化CD8⁺T细胞。

1.6 CD8⁺T细胞的体外刺激及其与乳腺癌细胞MCF-7共培养系统的建立

取上述12例HLA-A*02限制性乳腺癌患者PBMC和TIL来源的纯化CD8⁺T细胞,加入抗CD3/抗CD28(1 ng/mL)维持T细胞活性,并用重组人IL-37(0.1 ng/mL)^[10]刺激培养,48 h后洗涤,取1 × 10⁵个CD8⁺T细胞与5 × 10⁵个同为HLA-A*02限制性的乳腺癌MCF-7细胞建立共培养系统^[5]。直接接触共培养系统:将CD8⁺T细胞与MCF-7细胞直接混合接种于6孔板中,同时加入抗CD3/抗CD28(1 ng/mL)。间接接触共培养系统:将MCF-7细胞接种于Transwell下层培养板,CD8⁺T细胞接种于上层小室,加入抗CD3/抗CD28(1 ng/mL),上层小室底部为孔径为0.4 μm的滤膜,该孔径仅可溶性细胞因子可通过。两体系均在共培养48 h后收集细胞和上清液进行后续实验。

1.7 ELISA法检测血浆IL-37、可溶性SIGIRR及共

培养上清液中穿孔素、颗粒酶B、IFN-γ和TNF-α水平

采用双抗夹心法ELISA检测所有受试者(乳腺癌组、乳腺良性肿瘤组、对照组)血浆中IL-37与可溶性SIGIRR,以及直接接触和间接接触共培养系统上清液中穿孔素、颗粒酶B、IFN-γ和TNF-α水平。操作按说明书要求、常规方法进行。

1.8 实时荧光定量PCR检测组织中IL-37 mRNA相对表达量

取乳腺癌组患者肿瘤组织和癌旁组织,使用TRIzol试剂提取总RNA。取1 μg总RNA,将总RNA反转录为cDNA。采用FastStart DNA Master SYBR Green I实时定量PCR试剂盒、以cDNA为模板进行PCR反应。采用2^{-ΔΔCT}法对IL-37 mRNA相对表达量进行分析。引物序列参照既往发表文献^[11]合成。

1.9 流式细胞术检测CD8⁺T细胞IL-37受体亚基水平及免疫检查点分子CTLA-4、PD-1水平

将所有受试者(乳腺癌组、乳腺良性肿瘤组、对照组)PBMC或乳腺癌患者肿瘤/癌旁组织来源的TIL转入流式检测管中,洗涤后加入抗CD3-PerCP Cy5.5、抗CD8-FITC、抗-IL-18Rα-PE、抗-SIGIRR-APC流式抗体,4 °C避光染色30 min。收集直接接触和间接接触共培养系统中的细胞,转入流式检测管中,洗涤后加入抗CD3-PerCP Cy5.5、抗CD8-FITC、抗细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CTLA-4)-PE、抗程序性死亡受体-1(programmed death-1, PD-1)-APC流式抗体,4 °C避光染色30 min。所有样本染色后经洗涤、固定,上机检测分析。

1.10 LDH释放实验检测对靶细胞的毒性

测定上述直接接触和间接接触共培养系统上清LDH水平,以MCF-7细胞上清液中LDH水平作为“低水平LDH对照”,以Triton X-100处理的MCF-7细胞上清液中LDH水平作为“高水平LDH对照”。靶细胞死亡比例=(待测样本LDH水平-低水平LDH对照)/(高水平LDH对照-低水平LDH对照)×100%^[5]。

1.11 统计学处理

使用SPSS25.0软件进行统计学分析。首先进行正态性检验,所有计量资料均符合正态分布,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验或配对 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用LSD- t 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

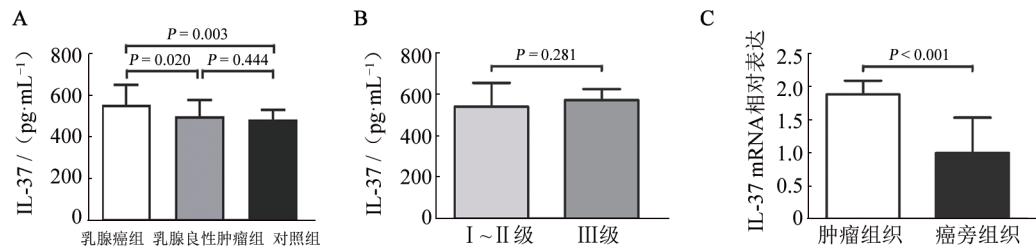
2 结果

2.1 乳腺癌患者中IL-37水平变化

乳腺癌组血浆IL-37水平显著高于乳腺良性肿

瘤组($t = 2.388, P = 0.020$, 图 1A)和对照组($t = 3.084, P = 0.003$, 图 1A)。血浆 IL-37 水平在乳腺良性肿瘤组与对照组之间的差异无统计学意义($t = 0.773, P = 0.444$, 图 1A)。血浆 IL-37 水平在 I~II 级和 III 级

浸润性导管癌之间的差异无统计学意义($t = 1.092, P = 0.281$, 图 1B)。乳腺癌患者肿瘤组织 IL-37 mRNA 相对表达量显著高于癌旁组织($t = 8.075, P < 0.001$, 图 1C)。



A: 血浆 IL-37 水平在乳腺癌组、乳腺良性肿瘤组、对照组之间的比较; B: 血浆 IL-37 水平在 I~II 级和 III 级浸润性导管癌之间的比较; C: IL-37 mRNA 相对表达量在乳腺癌患者肿瘤组织和癌旁组织中的比较。

图 1 乳腺癌患者血浆 IL-37 水平和肿瘤组织 IL-37 mRNA 表达水平

2.2 乳腺癌患者 CD8⁺ T 细胞 IL-18R α 和 SIGIRR 表达分析

采用流式细胞术检测乳腺癌患者、乳腺良性肿瘤患者、对照者 CD8⁺ T 细胞中 IL-18R α 和 SIGIRR 表达。利用对 CD3⁺CD8⁺ T 细胞圈门, 在 CD3⁺CD8⁺ T 细胞门内, 首先利用 PE 和 APC 同型对照抗体对阴性细胞进行检测, 然后分析 CD3⁺CD8⁺ T 细胞中 IL-18R α 和 SIGIRR 表达, 乳腺癌、乳腺良性肿瘤、对照者外周血 CD3⁺CD8⁺ T 细胞中 IL-18R α 和 SIGIRR 表达的典型峰图见图 2。外周血 SIGIRR⁺CD8⁺ 细胞比例和

IL-18R α ⁺CD8⁺ 细胞比例在乳腺癌患者、乳腺良性肿瘤患者、对照者之间的差异无统计学意义($F = 0.489, P = 0.965$, 图 3A; $F = 0.036, P = 0.615$, 图 3B)。血浆可溶性 SIGIRR 水平在乳腺癌患者、乳腺良性肿瘤患者、对照组之间的差异亦无统计学意义($F = 0.489, P = 0.600$, 图 3C)。IL-18R α ⁺CD8⁺ 细胞比例和 SIGIRR⁺CD8⁺ 细胞比例在乳腺癌患者肿瘤组织和癌旁组织之间的差异无统计学意义($t = 1.077, P = 0.287$, 图 4A; $t = 1.377, P = 0.175$, 图 4B)。

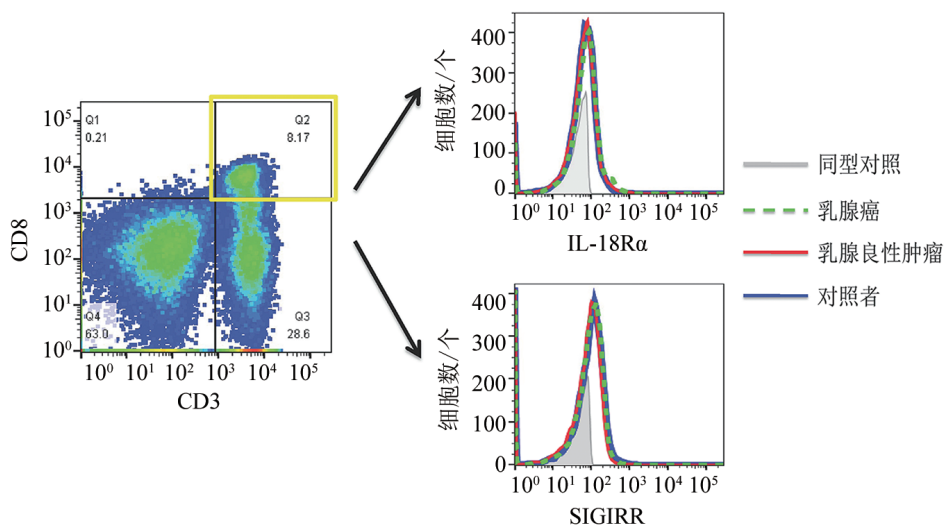


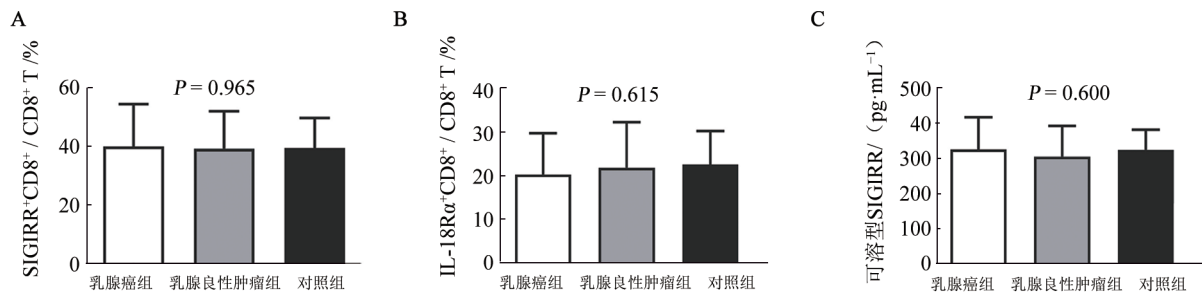
图 2 乳腺癌、乳腺良性肿瘤、对照者外周血 CD3⁺CD8⁺ T 细胞中 IL-18R α 和 SIGIRR 表达的典型峰图

2.3 重组人 IL-37 对乳腺癌患者外周血 CD8⁺ T 细胞功能的影响

重组人 IL-37 刺激后, 乳腺癌患者外周血分选的 CD8⁺ T 细胞诱导靶细胞死亡的比例在直接接触共培养系统($P = 0.014$)和间接接触共培养系统

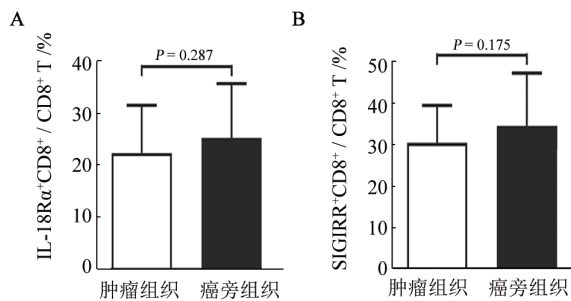
($P = 0.009$)中均显著降低(表 1)。在直接接触共培养系统中, IL-37 刺激后上清液中穿孔素和颗粒酶 B 水平均显著低于无刺激($P < 0.001$, 表 1), 但在间接接触共培养系统中, 上清液中穿孔素和颗粒酶 B 水平在无刺激和 IL-37 刺激之间的差异无统计学意义

($P > 0.05$, 表1)。在直接接触和间接接触共培养系统中, IL-37刺激后上清液中IFN- γ 和TNF- α 水平均显著低于无刺激($P < 0.05$, 表1)。



A: SIGIRR⁺CD8⁺ T细胞比例在乳腺癌组、乳腺良性肿瘤组、对照组之间的比较; B: IL-18R α ⁺CD8⁺ T细胞比例在乳腺癌组、乳腺良性肿瘤组、对照组之间的比较; C: 血浆可溶型SIGIRR在乳腺癌组、乳腺良性肿瘤组、对照组之间的比较。

图3 乳腺癌患者、乳腺良性肿瘤患者、对照者外周血CD8⁺ T细胞中IL-18R α 和SIGIRR比例、可溶型SIGIRR比较



A: IL-18R α ⁺CD8⁺ T细胞比例在乳腺癌患者肿瘤组织和癌旁组织中的比较; B: SIGIRR⁺CD8⁺ T细胞比例在乳腺癌患者肿瘤组织和癌旁组织中的比较。

图4 乳腺癌患者肿瘤组织和癌旁组织CD8⁺ T细胞中IL-18R α 和SIGIRR比例比较

直接接触共培养系统中, 乳腺癌患者外周血分选的CD8⁺ T细胞诱导靶细胞死亡的比例、上清液中穿孔素和颗粒酶B水平均显著高于间接接触共培养系统($P < 0.05$, 表1)。但上清液中IFN- γ 和TNF- α 水

平在直接接触和间接接触共培养系统中的差异无统计学意义($P > 0.05$, 表1)。重组人IL-37刺激后, 上清液中颗粒酶B水平显著高于间接接触共培养系统($P < 0.05$, 表1), 上清液中穿孔素、IFN- γ 和TNF- α 水平在直接接触和间接接触共培养系统中的差异无统计学意义($P > 0.05$, 表1)。直接接触共培养和间接接触共培养系统中, 流式细胞术检测CTLA-4和PD-1表达, 在CD3⁺CD8⁺ T细胞门内, 首先利用PE和APC同型对照抗体对阴性细胞进行检测, 然后分析CD3⁺CD8⁺ T细胞中CTLA-4和PD-1表达, 直接接触和间接接触共培养中CD3⁺CD8⁺ T细胞中CTLA-4和PD-1表达的典型散点图见图5。无刺激和IL-37刺激后CD8⁺ T细胞中CTLA-4和PD-1表达的典型流式散点图见图3。无论在直接接触还是间接接触共培养系统中, CTLA-4⁺CD8⁺细胞比例和PD-1⁺CD8⁺细胞比例在无刺激和IL-37刺激之间的差异均无统计学意义($P > 0.05$, 表1)。

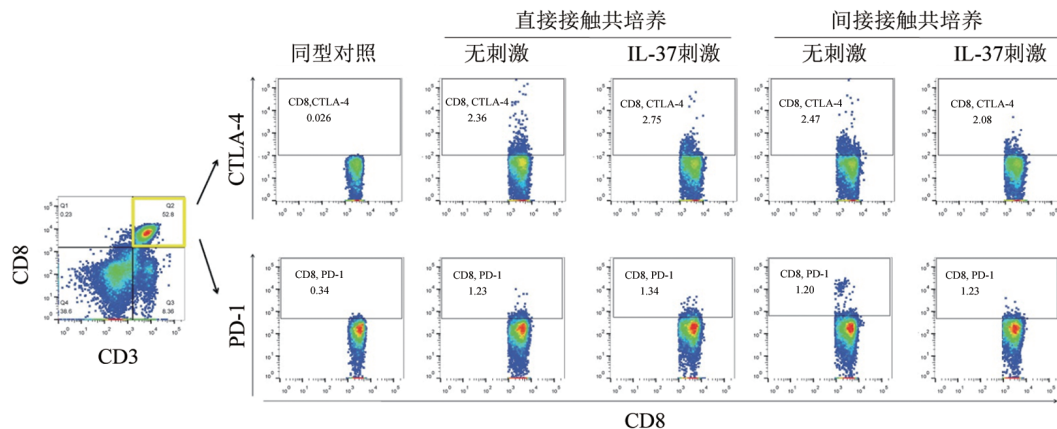


图5 乳腺癌患者外周血纯化的CD8⁺ T细胞与乳腺癌细胞系MCF-7直接接触和间接接触共培养后CD3⁺CD8⁺ T细胞中CTLA-4和PD-1表达的典型流式散点图

表1 乳腺癌患者外周血CD8⁺ T细胞无刺激和IL-37刺激后诱导靶细胞死亡和毒性分子、细胞因子分泌比较(n = 12)

项目	直接接触共培养				间接接触共培养			
	无刺激	IL-37刺激	t	P	无刺激	IL-37刺激	t	P
靶细胞死亡率/%	15.53 ± 3.85*	12.20 ± 1.90 [△]	2.684	0.014	6.07 ± 1.13	4.94 ± 0.78	2.844	0.009
穿孔素/(pg·mL ⁻¹)	73.71 ± 20.00*	47.54 ± 8.81	4.147	< 0.001	48.46 ± 9.04	43.32 ± 12.31	1.143	0.265
颗粒酶B/(pg·mL ⁻¹)	237.72 ± 103.6*	110.32 ± 50.81 [△]	3.824	< 0.001	128.29 ± 66.08	100.44 ± 28.39	1.341	0.194
IFN-γ/(pg·mL ⁻¹)	45.23 ± 3.21	41.61 ± 2.69	2.994	0.007	44.39 ± 1.86	40.70 ± 2.79	3.812	0.001
TNF-α/(ng·mL ⁻¹)	1.19 ± 0.35	0.84 ± 0.22	2.949	0.007	1.12 ± 0.37	0.79 ± 0.22	2.636	0.015
CTLA-4 ⁺ CD8 ⁺ /%	3.18 ± 1.37	3.05 ± 1.35	0.234	0.817	3.54 ± 1.57	2.98 ± 0.82	1.107	0.280
PD-1 ⁺ CD8 ⁺ /%	1.98 ± 0.30	1.92 ± 0.51	0.360	0.722	1.74 ± 0.32	1.87 ± 0.24	1.140	0.267

与间接接触共培养无刺激比较,*P < 0.05;与间接接触共培养IL-37刺激比较,[△]P < 0.05。

2.4 重组人IL-37对乳腺癌患者肿瘤组织CD8⁺ T细胞功能的影响

重组人IL-37刺激后,乳腺癌患者肿瘤组织分选的CD8⁺ T细胞诱导靶细胞死亡的比例在直接接触共培养系统(P = 0.011)和间接接触共培养系统(P = 0.002)中均显著降低(表2)。直接接触共培养系统中,IL-37刺激组上清液中穿孔素和颗粒酶B水平均显著低于无刺激组(P < 0.001,表2),但在间接接触共培养系统中,上清中穿孔素和颗粒酶B水平在无刺激和IL-37刺激之间的差异无统计学意义(P > 0.05,表2)。在直接接触和间接接触共培养系统中,IL-37刺激后上清中IFN-γ和TNF-α水平均显著低于无刺激(P < 0.05,表2)。

直接接触共培养系统中,乳腺癌患者肿瘤组织分选的CD8⁺ T细胞诱导靶细胞死亡的比例、上清中穿孔素和颗粒酶B水平均显著高于间接接触共培养系统(P < 0.05,表2)。但上清中IFN-γ和TNF-α水平在直接接触和间接接触共培养系统中的差异无统计学意义(P > 0.05,表2)。重组人IL-37刺激后,上清中颗粒酶B水平显著高于间接接触共培养系统(P < 0.05,表2),上清中穿孔素、IFN-γ和TNF-α水平在直接接触和间接接触共培养系统中的差异无统计学意义(P > 0.05,表2)。无论在直接接触还是间接接触共培养系统中,CTLA-4⁺CD8⁺细胞比例和PD-1⁺CD8⁺细胞比例在无刺激和IL-37刺激之间的差异均无统计学意义(P > 0.05,表2)。

表2 乳腺癌患者肿瘤组织CD8⁺ T细胞无刺激和IL-37刺激后诱导靶细胞死亡和毒性分子、细胞因子分泌比较(n = 12)

项目	直接接触共培养				间接接触共培养			
	无刺激	IL-37刺激	t	P	无刺激	IL-37刺激	t	P
靶细胞死亡率/%	17.95 ± 4.93*	13.44 ± 2.67 [△]	2.791	0.011	7.43 ± 1.39	5.76 ± 0.79	3.628	0.002
穿孔素/(pg·mL ⁻¹)	71.16 ± 12.94*	47.40 ± 11.33	4.784	< 0.001	46.90 ± 10.45	44.40 ± 9.12	0.623	0.540
颗粒酶B/(pg·mL ⁻¹)	290.13 ± 97.81*	142.34 ± 64.37 [△]	4.373	< 0.001	94.50 ± 27.58	92.96 ± 42.92	0.105	0.917
IFN-γ/(pg·mL ⁻¹)	40.27 ± 14.71	23.29 ± 10.46	3.259	0.004	28.96 ± 12.03	16.83 ± 7.47	2.968	0.007
TNF-α/(ng·mL ⁻¹)	1.17 ± 0.44	0.80 ± 0.18	2.687	0.014	1.13 ± 0.28	0.87 ± 0.24	2.412	0.025
CTLA-4 ⁺ CD8 ⁺ /%	3.19 ± 1.54	3.26 ± 1.26	0.129	0.899	2.88 ± 0.82	2.83 ± 0.68	0.155	0.879
PD-1 ⁺ CD8 ⁺ /%	1.98 ± 0.28	1.95 ± 0.16	0.338	0.739	1.82 ± 0.21	1.80 ± 0.20	0.278	0.783

与间接接触共培养无刺激比较,*P < 0.05;与间接接触共培养IL-37刺激比较,[△]P < 0.05。

3 讨论

虽然IL-37在免疫应答中发挥抗炎作用,但在不同组织来源的恶性肿瘤中发挥的作用却不尽相同^[12]。IL-37在前列腺癌、宫颈癌、非小细胞肺癌、肝细胞癌中发挥抗肿瘤活性^[13]。体外实验研究发现,IL-37对前列腺癌细胞系DU145和PC-3增殖分化的影响较小,但可抑制抗凋亡基因CDK2表达,诱导促凋亡基因p27、Fas、BAX表达,增强放射治疗介导的细胞增殖抑制并促进凋亡,提示IL-37可能是前列腺癌放射治疗的增敏剂^[14]。

与之相似的是,IL-37可上调宫颈癌细胞系HeLa和C33A中促凋亡基因B细胞淋巴瘤-2促细胞凋亡(B-cell lymphoma 2 interacting mediator of cell death, BIM)表达,IL-37可促进HeLa和C33A细胞凋亡,而抑制BIM表达可降低IL-37介导的细胞凋亡,提示在宫颈癌中IL-37可通过Bim介导的信号通路促进肿瘤细胞凋亡,发挥抗肿瘤活性^[15]。IL-37可通过抑制IL-6/STAT3信号通路抑制非小细胞肺癌侵袭和转移^[16],还可通过抑制血管生成发挥抑制非小细胞肺癌发生发展的作用^[17]。IL-37在肝细胞癌组织中的表达较癌旁组织显著降低,

与血清甲胎蛋白水平呈负相关,与核因子- κ B水平亦呈负相关^[18]。IL-37可通过间接促进树突状细胞向肿瘤组织募集活化^[19]、诱导肿瘤细胞自噬^[20]、抑制肿瘤微环境中肿瘤相关巨噬细胞向M2极化^[21],发挥抑制肝细胞癌的活性。与之相反,膀胱移行细胞癌患者血清IL-37水平显著升高,与机体免疫抑制和肿瘤大小密切相关^[22]。IL-37不但可通过其受体SIGIRR介导的信号通路抑制CD103⁺树突状细胞糖酵解,促进化学诱导剂DMBA/TPA介导的皮肤肿瘤发生发展^[23],还可通过SIGIRR介导的细胞毒性CD8⁺ T细胞功能衰竭,促进结肠炎相关结肠肿瘤发生^[9]。转移性和非转移性乳腺癌患者血液中IL-37 mRNA相对表达量均低于对照者,而在ER⁺/PR⁺/HER2⁺非转移患者中的水平则高于HER2⁺患者,提示乳腺癌患者中IL-37水平可能与疾病进展阶段相关^[11,24]。但本研究发现了不尽相同的结果,乳腺癌患者外周血IL-37水平高于乳腺良性肿瘤患者和对照者,但IL-37水平在I~II级和III级浸润性导管癌之间无明显差异,提示血浆IL-37水平与疾病进程可能无关,乳腺癌肿瘤组织中IL-37 mRNA水平亦高于癌旁组织。上述结果提示,乳腺癌患者IL-37在外周血和肿瘤微环境中水平均显著升高,但无论可溶型SIGIRR还是CD8⁺ T细胞表面表达的膜型SIGIRR在乳腺癌患者、乳腺良性肿瘤患者和对照者之间的无明显差异,这与在乙型肝炎病毒感染中的研究结果一致^[10]。可溶型SIGIRR主要来源于膜型SIGIRR水平从免疫细胞表面脱落,可溶型SIGIRR可通过中和作用降低IL-37表达^[9,10],但本研究仍发现IL-37在乳腺癌患者中水平显著升高,提示可溶型SIGIRR虽然中和了部分IL-37表达,但IL-37仍可能通过膜型SIGIRR调控CD8⁺ T细胞活性,但IL-37在乳腺癌CD8⁺ T细胞免疫调控中发挥何种功能有待进一步研究。

IL-37可调控病原体感染和恶性肿瘤中CD8⁺ T细胞功能。在粪圆线虫感染中,中和IL-37可抑制寄生虫抗原诱导的辅助性CD4⁺ T细胞和杀伤性CD8⁺ T细胞应答,降低多种促炎因子分泌,促进抑制性细胞因子IL-10表达,说明IL-37在寄生虫感染过程中可抑制T细胞应答^[25]。急性乙肝患者中IL-37水平降低,与转氨酶水平呈负相关,外源性IL-37可通过抑制穿孔素、颗粒酶B、IFN- γ 和TNF- α 分泌抑制病毒特异性CD8⁺ T细胞介导的细胞杀伤和病毒抑制^[10]。IL-37可抑制IL-18诱导的CD8⁺ T细胞增殖和效应活性,促进结肠癌患者CD8⁺ T细胞功能衰竭^[9]。由于本课题组既往研究发现乳腺癌患者中存在CD8⁺ T细胞功能衰竭^[5],为此本研究探讨IL-37对外周血和肿瘤微环境中CD8⁺ T细胞功能的影响。CD8⁺ T细胞发挥杀伤功能首先有赖于HLA分子和抗原匹配,然后CD8⁺ T细胞可通过穿孔素-颗粒酶介导、依

赖细胞间直接接触的途径直接发挥杀伤靶细胞的作用,还可通过分泌IFN- γ 和TNF- α 等炎性细胞因子发挥细胞杀伤,此过程并不依赖细胞间直接接触^[26]。因此,本课题组利用既往建立的CD8⁺ T细胞与HLA分子相匹配的乳腺癌细胞系的直接接触和间接接触共培养系统^[5],评估IL-37对乳腺癌患者CD8⁺ T细胞功能影响。在直接接触共培养系统中,CD8⁺ T细胞可通过穿孔素-颗粒酶途径和炎性细胞因子发挥细胞杀伤活性,在间接接触共培养系统中,CD8⁺ T细胞仅通过炎性细胞因子发挥作用^[26]。本研究发现,重组人IL-37对乳腺癌患者外周血和肿瘤组织中纯化的CD8⁺ T细胞的调控效应一致。IL-37刺激后,CD8⁺ T细胞介导的靶细胞死亡在直接接触和间接接触共培养系统中均显著降低,直接接触共培养中靶细胞死亡比例高于间接接触共培养,这提示穿孔素-颗粒酶途径和炎性细胞因子在CD8⁺ T细胞的介导的乳腺癌细胞杀伤活性中均发挥了作用。在直接接触共培养系统中,IL-37刺激后穿孔素、颗粒酶B、IFN- γ 和TNF- α 水平均降低,但在间接接触共培养系统中,IL-37刺激后仅IFN- γ 和TNF- α 水平均降低,这进一步说明穿孔素-颗粒酶途径需要依赖细胞间直接接触,而IL-37则抑制了CD8⁺ T细胞通过穿孔素-颗粒酶途径和炎性细胞因子的杀伤活性,可能参与诱导乳腺癌患者CD8⁺ T细胞衰竭。两种共培养系统中,IL-37刺激后CD8⁺ T细胞中CTLA-4和PD-1水平均无明显变化,提示IL-37可能并非通过影响免疫检查点分子表达诱导乳腺癌患者CD8⁺ T细胞功能衰竭,IL-37诱导CD8⁺ T细胞功能衰竭的机制仍需进一步探索。

本研究具有一定的局限性。一方面,基于伦理学要求,患者肿瘤组织和癌旁组织需要留取足够的标本量进行病理学检测以明确诊断,指导下一步治疗。本研究还需要纯化组织标本中的CD8⁺ T细胞。因此,本研究仅对组织标本中IL-37 mRNA水平进行检测,未检测IL-37蛋白水平。另一方面,恶性肿瘤患者发病中也存在复杂的细胞因子和免疫细胞相互作用^[27],根据本研究结果,IL-37在乳腺癌中的作用可能并不显著,同时,多种免疫细胞(包括:树突状细胞、巨噬细胞、调节性T细胞等)均表达IL-37受体^[6-8],因此,IL-37也可能通过影响除CD8⁺ T细胞外的其他免疫细胞发挥抑制抗肿瘤免疫应答的作用,可能还需要单细胞测序或动物实验进一步证实。

综上,乳腺癌患者外周血IL-37水平升高,IL-37可能通过抑制穿孔素-颗粒酶途径和炎性细胞因子介导乳腺癌患者外周血和肿瘤微环境中CD8⁺ T细胞功能衰竭,诱导肿瘤疾病进展。IL-37可能成为乳腺癌治疗的新靶点之一。

[参考文献]

- [1] NIKITA SANDEEP WAGLE MBBS M, *et al.* Cancer statistics, 2023[J]. *CA A Cancer J Clin*, 2023, 73(1): 17-48. DOI: 10.3322/caac.21763.
- [2] 吕思彤, 韩丹娜, 杨洋. 靶向肿瘤相关脂肪微环境在乳腺癌治疗中的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2025, 32(2): 213-218. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.02.010.
- [3] YANG A R, ZHOU M, GAO Y X, *et al.* Mechanisms of CD8⁺ T cell exhaustion and its clinical significance in prognosis of anti-tumor therapies: a review[J/OL]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 159: 114843[2025-06-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40394796/>. DOI:10.1016/j.intimp.2025.114843.
- [4] MCLANE L M, ABDEL-HAKEEM M S, WHERRY E J. CD8 T cell exhaustion during chronic viral infection and cancer[J]. *Annu Rev Immunol*, 2019, 37: 457-495. DOI:10.1146/annurev-immunol-041015-055318.
- [5] 秦双, 董良鹏, 白宾, 等. Toll样受体7对乳腺癌患者CD8⁺ T细胞功能的影响[J]. *中华医学杂志*, 2019, 99(20): 1562-1566. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2019.20.009.
- [6] SU Z, TAO X. Current understanding of IL-37 in human health and disease[J/OL]. *Front Immunol*, 2021, 12: 696605[2025-06-25]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.696605>. DOI: 10.3389/fimmu.2021.696605.
- [7] BAI J, LI Y, LI M, *et al.* IL-37 as a potential biotherapeutics of inflammatory diseases [J]. *Curr Drug Targets*, 2020, 21(9): 855-863. DOI: 10.2174/1389450121666200429114926.
- [8] CAVALLI G, DINARELLO C A. Suppression of inflammation and acquired immunity by IL-37[J]. *Immunol Rev*, 2018, 281(1): 179-190. DOI:10.1111/imr.12605.
- [9] WANG Z, ZENG F L, HU Y W, *et al.* Interleukin-37 promotes colitis-associated carcinogenesis via SIGIRR-mediated cytotoxic T cells dysfunction[J/OL]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 19[2025-06-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35046386/>. DOI: 10.1038/s41392-021-00820-z.
- [10] LIU Q, ZHOU Q, WANG M R, *et al.* Interleukin-37 suppresses the cytotoxicity of hepatitis B virus peptides-induced CD8⁺ T cells in patients with acute hepatitis B[J]. *Biomol Biomed*, 2023, 23(3): 527-534. DOI:10.17305/bjbm.2022.8260.
- [11] FARAHANI N, MOHAGHEGHI F, MOSAYEBI G, *et al.* Reduced IL-37 gene expression and CD8 T lymphocytes in patients with metastatic breast cancer[J]. *Breast Dis*, 40(4): 235-240. DOI:10.3233/bd-201055.
- [12] ZHU Y L, QIN H, YE K, *et al.* Dual role of IL-37 in the progression of tumors[J/OL]. *Cytokine*, 2022, 150: 155760[2025-06-25]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155760>. DOI:10.1016/j.cyto.2021.155760.
- [13] MEI Y, LIU H Y. IL-37: an anti-inflammatory cytokine with antitumor functions[J/OL]. *Cancer Rep*, 2019, 2(2): e1151[2025-06-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32935478/>. DOI:10.1002/cnr.2.1151.
- [14] DING V A, ZHU Z W, STEELE T A, *et al.* The novel role of IL-37 in prostate cancer: evidence as a promising radiosensitizer[J/OL]. *Med Oncol*, 2017, 35(1): 6[2025-06-25]. <http://dx.doi.org/10.1007/s12032-017-1070-7>. DOI:10.1007/s12032-017-1070-7.
- [15] OUYANG P, AN W F, CHEN R H, *et al.* IL-37 promotes cell apoptosis in cervical cancer involving Bim upregulation[J]. *OncoTargets Ther*, 2019, 12: 2703-2712. DOI:10.2147/ott.s201664.
- [16] JIANG M F, WANG Y, ZHANG H, *et al.* IL-37 inhibits invasion and metastasis in non-small cell lung cancer by suppressing the IL-6/STAT3 signaling pathway[J]. *Thorac Cancer*, 2018, 9(5): 621-629. DOI: 10.1111/1759-7714.12628.
- [17] GE G Q, WANG A Q, YANG J Y, *et al.* Interleukin-37 suppresses tumor growth through inhibition of angiogenesis in non-small cell lung cancer [J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35(1): 13[2025-06-25]. <http://dx.doi.org/10.1186/s13046-016-0293-3>. DOI:10.1186/s13046-016-0293-3.
- [18] LI P, GUO H S, WU K, *et al.* Decreased IL-37 expression in hepatocellular carcinoma tissues and liver cancer cell lines[J]. *Oncol Lett*, 2020, 19(4): 2639-2648. DOI:10.3892/ol.2020.11393.
- [19] LIU Y, ZHAO J J, ZHOU Z Q, *et al.* IL-37 induces anti-tumor immunity by indirectly promoting dendritic cell recruitment and activation in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 6691-6702. DOI:10.2147/CMAR.S200627.
- [20] LI T T, ZHU D, MOU T, *et al.* IL-37 induces autophagy in hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Mol Immunol*, 2017, 87: 132-140. DOI: 10.1016/j.molimm.2017.04.010.
- [21] ZHANG Z H, ZHANG J W, HE P, *et al.* Interleukin-37 suppresses hepatocellular carcinoma growth through inhibiting M2 polarization of tumor-associated macrophages[J]. *Mol Immunol*, 2020, 122: 13-20. DOI:10.1016/j.molimm.2020.03.012.
- [22] HAGHSHENAS M R, HOSSEINI S R, FATTAHI M J, *et al.* Elevated IL-37 serum levels in patients with transitional cell carcinoma of bladder[J]. *Iran J Immunol*, 2021, 18(4): 346-353. DOI:10.22034/IJI.2021.92669.2167.
- [23] ZENG F L, WANG X Y, HU Y W, *et al.* Interleukin-37 promotes DMBA/TPA skin cancer through SIGIRR-mediated inhibition of glycolysis in CD103⁺DC cells[J/OL]. *MedComm*, 2023, 4(2): e229 [2025-06-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36891351/>. DOI: 10.1002/mco2.229.
- [24] MA Y T, SU H, WANG X Y, *et al.* The role of IL-35 and IL-37 in breast cancer-potential therapeutic targets for precision medicine[J/OL]. *Front Oncol*, 2022, 12: 1051282[2025-06-25]. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1051282>. DOI:10.3389/fonc.2022.1051282.
- [25] ANURADHA R, MUNISANKAR S, BHOTRA Y, *et al.* Modulation of CD4⁺ and CD8⁺ T cell function and cytokine responses in *Strongyloides stercoralis* infection by interleukin-27 (IL-27) and IL-37 [J/OL]. *Infect Immun*, 2017, 85(11): e00500-17[2025-06-25]. <https://doi.org/10.1128/iai.00500-17>. DOI:10.1128/iai.00500-17.
- [26] IWAHORI K. Cytotoxic CD8⁺ lymphocytes in the tumor microenvironment[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1224: 53-62. DOI: 10.1007/978-3-030-35723-8_4.
- [27] PROPPER D J, BALKWILL F R. Harnessing cytokines and chemokines for cancer therapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, 19(4): 237-253. DOI: 10.1038/s41571-021-00588-9.

[收稿日期] 2024-11-03

[修回日期] 2025-06-27

[本文编辑] 黄静怡