

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2024.04.0295

论著

乳腺癌 eIF4E 对免疫细胞浸润的影响及机制的初步研究

李鑫, 韩继媛, 李帆, 习贵富, 游思頔, 张丹芳
(天津医科大学病理学教研室, 天津 300070)

摘要 目的: 研究乳腺癌真核翻译起始因子 4E (eIF4E) 表达对免疫细胞浸润的影响及作用机制。方法: 从癌症基因组图谱 (TCGA) 网站获取乳腺癌数据, 分析 eIF4E 的表达与预后和临床特征的关系。通过 TISIDB 数据库分析乳腺癌 eIF4E 表达与免疫亚型及免疫细胞浸润的关系。通过单样本基因集富集分析对免疫细胞浸润和上皮-间充质转化 (EMT) 抑制基因集进行评分; 分析 eIF4E 不同表达水平时免疫细胞浸润的差异以及 EMT 抑制基因集和免疫细胞浸润的相关性。蛋白免疫印迹和免疫荧光实验研究乳腺癌 eIF4E 表达对 EMT 相关蛋白表达的影响, Transwell 实验研究 eIF4E 表达对乳腺癌细胞迁移和侵袭能力的影响。结果: eIF4E 在乳腺癌淋巴细胞减少型 (C4) 中表达最高。乳腺癌中 eIF4E 高表达时抗肿瘤免疫细胞浸润减少 ($P < 0.05$), 免疫抑制细胞浸润增多 ($P < 0.05$); 同时 eIF4E 表达与 EMT 抑制基因集评分呈负相关 ($P < 0.05$), 而 EMT 抑制基因集评分与许多抗肿瘤免疫细胞浸润呈正相关 (均 $P < 0.05$)。免疫印迹结果显示, 乳腺癌 eIF4E 高表达时 EMT 相关蛋白波形蛋白 (Vimentin) 的表达升高 ($t = 11.83, 5.927$, 均 $P < 0.05$), 而 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 表达降低 ($t = 2.848, 8.599$, 均 $P < 0.05$), 免疫荧光实验得到了相同的结果 ($t = 6.577, 7.843, 12.48, 4.406$, 均 $P < 0.05$)。Transwell 实验显示 eIF4E 的高表达增强了乳腺癌细胞迁移和侵袭能力 ($t = 13.81, 8.9, 15.27, 4.954$, 均 $P < 0.05$)。结论: 乳腺癌 eIF4E 表达通过促进 EMT 来影响免疫细胞的浸润。

关键词 真核翻译起始因子 4E; 乳腺癌; 免疫细胞浸润; 上皮-间充质转化

中图分类号 R737.9

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2024)04-0295-10

Preliminary study on the effect of eIF4E on immune cell infiltration and mechanism in breast cancer

LI Xin, HAN Jiyuan, LI Fan, XI Guifu, YOU Sidi, ZHANG Danfang

(Department of Pathology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To study the effect of breast cancer eIF4E expression on immune cell infiltration and its mechanism of action.

Methods: Breast cancer data were obtained from The Cancer Genome Atlas (TCGA) website to analyze the association of eIF4E expression with prognosis and clinical features. Breast cancer eIF4E expression was analyzed in relation to immune subtypes and immune cell infiltration by the TISIDB database. Immune cell infiltration and epithelial-mesenchymal transition (EMT) suppressor gene sets were scored by single-sample gene set enrichment analysis. The differences in immune cell infiltration at different expression levels of eIF4E, and the correlation between EMT suppressor gene sets and immune cell infiltration were analyzed. Protein immunoblotting and immunofluorescence experiments were performed to study the effect of eIF4E expression on EMT-related protein expression in breast cancer, and Transwell experiments were performed to study the effect of eIF4E expression on the migration and invasion ability of breast cancer cells. **Results:** The expression of eIF4E was highest in lymphopenic type (C4) of breast cancer. Antitumor immune cell infiltration was reduced ($P < 0.05$) and immunosuppressive cell infiltration was increased ($P < 0.05$) with high eIF4E expression in breast cancer. Meanwhile, eIF4E expression was negatively correlated with the EMT suppressor gene set score ($P < 0.05$), whereas the EMT suppressor gene set score was positively correlated with the infiltration of many antitumor immune cells (all $P < 0.05$). Immunoblotting results showed that the expression of EMT-associated protein Vimentin was increased in breast cancer with high expression of eIF4E ($t = 11.83, 5.927$, both $P < 0.05$), whereas the expression of E-cadherin was decreased ($t = 2.848, 8.599$, both $P < 0.05$), and immunofluorescence experiments obtained the same results ($t = 6.577, 7.843, 12.48, 4.406$, all $P < 0.05$). Transwell assay showed that high expression of eIF4E enhanced breast cancer cell migration and invasion ($t = 13.81, 8.9, 15.27, 4.954$, all $P < 0.05$). **Conclusion:** The expression of breast cancer eIF4E influences immune cell infiltration by promoting EMT.

Key words eIF4E; breast cancer; immune cell infiltration; epithelial-mesenchymal transition

女性乳腺癌已经超过肺癌, 成为全球癌症发病

率高的主要原因^[1]。近年来乳腺癌的发病率呈现出明显上升趋势, 且患者年龄也呈现出年轻化的特点^[2]。而乳腺癌作为免疫“冷”肿瘤, 对免疫疗法反应非常有限。冷肿瘤是指一种缺乏免疫细胞浸润、具有非

基金项目 天津市教科科研项目 (2020KJ198)

作者简介 李鑫 (1999-), 女, 硕士在读, 研究方向: 病理学; 通信作者: 张丹芳, E-mail: zhangdf@tmu.edu.cn。

炎症性肿瘤微环境(TME)且对免疫治疗无反应的肿瘤。这些肿瘤细胞难以被免疫系统识别,因此容易逃避抗肿瘤免疫细胞的攻击。将冷肿瘤转化为热肿瘤有利于改善患者预后,对提高患者生存率有重要意义^[3]。因此,研究乳腺癌免疫抑制微环境机制变得至关重要。

蛋白质转录翻译失调会影响肿瘤的生长和转移,真核翻译起始因子 4E(eukaryotic translation initiation factor 4, eIF4E)作为真核蛋白翻译起始因子复合体的重要组成部分之一,对 mRNA 的转录和调控起重要作用。已有研究证明,eIF4E 的高表达能促进上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程的发生,增加乳腺肿瘤血管生成拟态^[4]。然而,目前尚不清楚 eIF4E 是否会影响乳腺癌免疫细胞浸润以及相关的机制。EMT 是上皮细胞获得间充质细胞表型,失去细胞间和细胞外基质黏附,从而与原发肿瘤分离的过程^[5]。EMT 能促进乳腺癌细胞增殖和转移,增加乳腺癌干性^[6-7];同时,也可以通过间充质样肿瘤细胞来促进肿瘤发生,并形成免疫抑制和免疫逃避^[8-10]。因此,本研究探讨乳腺癌 eIF4E 是否通过调节 EMT 过程从而影响免疫细胞浸润。

1 材料与方法

1.1 数据的获取 从癌症基因组图谱(TCGA)数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)中收集有关乳腺癌的基因转录组数据和临床数据,其中包含 98 个正常样本和 1 110 个肿瘤样本。肿瘤样本包含 Luminal A、Luminal B、HER2、Basal、Normal 分子亚型,包括未经治疗、经过放疗和药物治疗的样本。排除缺失基因表达数据和生存时间、生存状态、肿瘤 Stage 分期、TNM 分期不完整的样本,其他样本均纳入分析。GSEA MSigDB ([gsea-msigdb.org](https://www.gsea-msigdb.org/))获得上皮-间充质转化抑制基因集(EMT-Down)(基因集名称:SAR-RIO_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION_DN.v2023.2.Hs)。免疫评分基因集出自文献(DOI: 10.7150/ijbs.45050)。

1.2 数据预处理 将 Ensembl ID 转换为基因名。利用 R 语言中相应的“expression 包”提取 eIF4E 表达数据。利用 R 语言的“ssGSEA”包进行免疫评分(该评分代表肿瘤组织中免疫细胞的浸润)和 EMT-Down 评分。最后,通过 R 语言的“expTime 包”完成表达数据、评分结果和临床数据的合并。

1.3 生存分析 采用 R 包中的“survival”进行生存分析,根据表达或评分结果的最佳截断值将样本分为高表达组和低表达组,评估不同组之间的生存

差异。

1.4 森林图 TIMER 数据库“生存”模块获取 Cox 回归结果,包括风险比和 *P* 值,利用 GraphPad Prism 9.0 进行可视化。

1.5 受试者工作特征(ROC)曲线 采用 R 语言包“ROC”获取 TCGA 乳腺癌中 eIF4E 的 ROC 曲线。

1.6 差异表达 将 eIF4E 表达数据按癌旁、肿瘤、年龄、Stage 分期、TNM 分期分为不同的组别,利用 R 包“boxplotClinical”进行差异可视化。通过 TISIDB 数据库“Subtype”模板分析 eIF4E 表达和免疫亚型的关系。将 eIF4E 表达数据按中位数分为高表达组和低表达组,利用 R“boxplotDiff 包”进行两组间免疫评分和 EMT-Down 的差异分析;同样,将 EMT-Down 评分按中位数分为高表达组和低表达组,使用相同的方法进行两组间免疫评分的差异分析。

1.7 相关性分析 通过 TISIDB 数据库分析乳腺癌 eIF4E 表达和免疫浸润、免疫激活分子和 MHC 分子之间的相关性。TIMER 数据库分析乳腺癌 eIF4E 与免疫细胞的标记基因之间的相关性。使用仙桃学术分析 EMT-Down 与免疫评分之间的相关性。

1.8 细胞及质粒 MDA-MB-231 和 MCF-7 人乳腺癌细胞购自上海富恒生物科技有限公司,293T 购自 ATCC 公司。eIF4E 上调质粒(EX-A4264-Lv122)、上调对照质粒(EX-NEG-Lv122)和 eIF4E 下调对照质粒(CSHCTR001-LVRU6GP)均购自广州 Genecopoeia 公司。利用 PLKO.1-puro 载体,克隆靶向 eIF4E 的 SH-RNA,构建下调 eIF4E 质粒(5'-CCGGCCAAA-GATAGTGATTGGTTATCTCGAGATAACCAATCAC-TATCTTTGGTTTTTG-3')。

1.9 主要试剂及仪器 GAPDH(中杉金桥)作为蛋白质对照。eIF4E 一抗(sc-9976)购自 Santa Cruz。E-钙黏蛋白(E-cadherin)一抗(#3195)购自 Cell Signaling Technology。波形蛋白(Vimentin)一抗(ab 92547)购自 Abcam。蛋白免疫印迹二抗和免疫荧光二抗均购自中杉金桥公司。Transwell 小室购自甄选公司;Lentii-pactm HIV Expression Kit 转染试剂盒购自广州 Genecopoeia 公司;倒置光学显微镜(尼康)用于拍照。

1.10 细胞培养及处理 乳腺癌细胞和 293 T 细胞于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养,用含 10%FBS、1%双抗(链霉素和青霉素)的 DMEM 培养基培养。使用 Lentii-pactm HIV Expression Kit 转染试剂盒,借助工具细胞 293 T 进行慢病毒包装,48 h 收取病毒液。用病毒液转染乳腺癌细胞以获得稳定转染细胞系:MDA-MB-231-SH-Control、MDA-MB-231-SH-

eIF4E、MCF-7-EX-Control、MCF-7-EX-eIF4E。

1.11 Transwell 迁移侵袭实验 细胞迁移实验中,将细胞制成无血清细胞悬浮液并进行细胞计数,加入 1×10^5 个细胞到 Transwell 的小室中。在 24 孔板中加入含 10% FBS 的 DMEM,将小室放入 24 孔板,细胞置于 37°C 孵育 24 h 后,用甲醇固定 30 min,并用结晶紫染色 30 min。侵袭实验与迁移实验相同,区别在于将细胞置入小室之前,在 Transwell 小室内铺上提前按比例配制的 Matrigel。使用倒置光学显微镜 $10\times$ (尼康)对这些细胞进行拍照计数。

1.12 蛋白免疫印迹 用 SDS 裂解缓冲液提取对照及稳定转染细胞系蛋白,配制 10%SDS-PAGE 分离胶进行电泳并将蛋白转移到 PVDF 膜上。用 5%脱脂牛奶封闭膜 1 h 后,加入特异性一抗 eIF4E (1:200)、E-cadherin (1:1 000)、Vimentin (1:1 000) 和 GAPDH (1:2 000) 在 4°C 下孵育过夜。恢复室温, TBST 漂洗 3 次后二抗 (1:2 000) 37°C 孵育 2 h。TBST 再次漂洗 3 次后使用发光液用扫描仪进行曝光,保存图像并用 Image J 软件分析。

1.13 免疫荧光 将乳腺癌细胞提前铺在玻片上待其贴壁后,甲醇固定 30 min, 0.1% Triton X-100 渗透 15 min, 5% FBS 封闭 1 h。然后,用一抗 E-cadherin (1:100) 和 Vimentin (1:100) 在 4°C 孵育过夜。用荧光蛋白耦联的二抗 (1:200) 孵育后,细胞核用 DAPI (Sigma) 反染。通过荧光显微镜 $20\times$ 获得图像。

1.14 统计学处理 采用 R 4.1.0 软件,运用“boxplotDiff”和“boxplotClinical”包进行组间的统计学差异可视化;运用“survival”包进行生存分析并绘图。运用 Spearman 进行相关性分析。使用 GraphPad Prism 9.0 对实验数据进行分析并作图。数据符合正态分布,两组间均数比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌 eIF4E 表达的预后和临床特征分析 eIF4E 表达升高与乳腺癌预后不良显著相关(图 1A, $P < 0.05$)。如图 1B 比例风险模型分析显示,在乳腺癌中 eIF4E 是独立的预后因素($HR=1.655$, $P < 0.05$)。此外, eIF4E 表达水平区分乳腺癌和正常对照的曲线下面积(AUC)为 0.701(图 1C)。通过分析乳腺癌 eIF4E 表达和临床特征,发现乳腺癌 eIF4E 表达显著高于癌旁组织(图 1D, $P < 0.05$); 61~80 岁的患者 eIF4E 表达显著高于 41~60 岁及 81~100 岁年龄段患者(图 1E, $P < 0.05$); 淋巴结分期 N2 中 eIF4E 表达量最高,与 N3 差异有统计学意义(图 1F, $P < 0.05$); 未发生远端转移的 M0 组中 eIF4E 的表达显著高于

正常组及远端转移 M1 组(图 1G, $P < 0.05$); 在 T1~T4 中 eIF4E 的表达均显著高于正常组,且 T4 显著高于 T3(图 1H, $P < 0.05$); Stage III 组中 eIF4E 的表达显著高于正常组及 Stage IV 组(图 1I, $P < 0.05$)。同时,在乳腺癌不同免疫亚型中 eIF4E 在淋巴细胞减少型(C4)中表达最高(图 1J, $P < 0.05$)。

2.2 TISIDB 数据库中乳腺癌 eIF4E 表达与免疫细胞浸润水平和免疫标记基因表达的相关性分析 研究表明, eIF4E 的表达在泛癌中对免疫细胞浸润程度有不同的影响。如图 2A 显示,在肾上腺皮质癌、乳腺癌、前列腺癌和甲状腺癌中, eIF4E 的表达和大多数免疫细胞浸润呈负相关;而在多形性胶质细胞瘤、脑低级别胶质瘤和间皮瘤中, eIF4E 表达和免疫细胞浸润呈正相关。在乳腺癌中 eIF4E 表达与 Act CD8⁺T、Th1 和 NK 细胞等免疫细胞浸润程度呈负相关,而与 Th2 细胞浸润呈正相关(图 2A~2E, 均 $P < 0.05$)。同时,乳腺癌 eIF4E 的表达和 CD40、CD48、KLRK1 和 TNFRSF4 等大多免疫激活分子呈负相关(图 2F~2J, 均 $P < 0.05$)。与主要组织相容性复合体(MHC)呈负相关(图 2K~2O, 均 $P < 0.05$)。

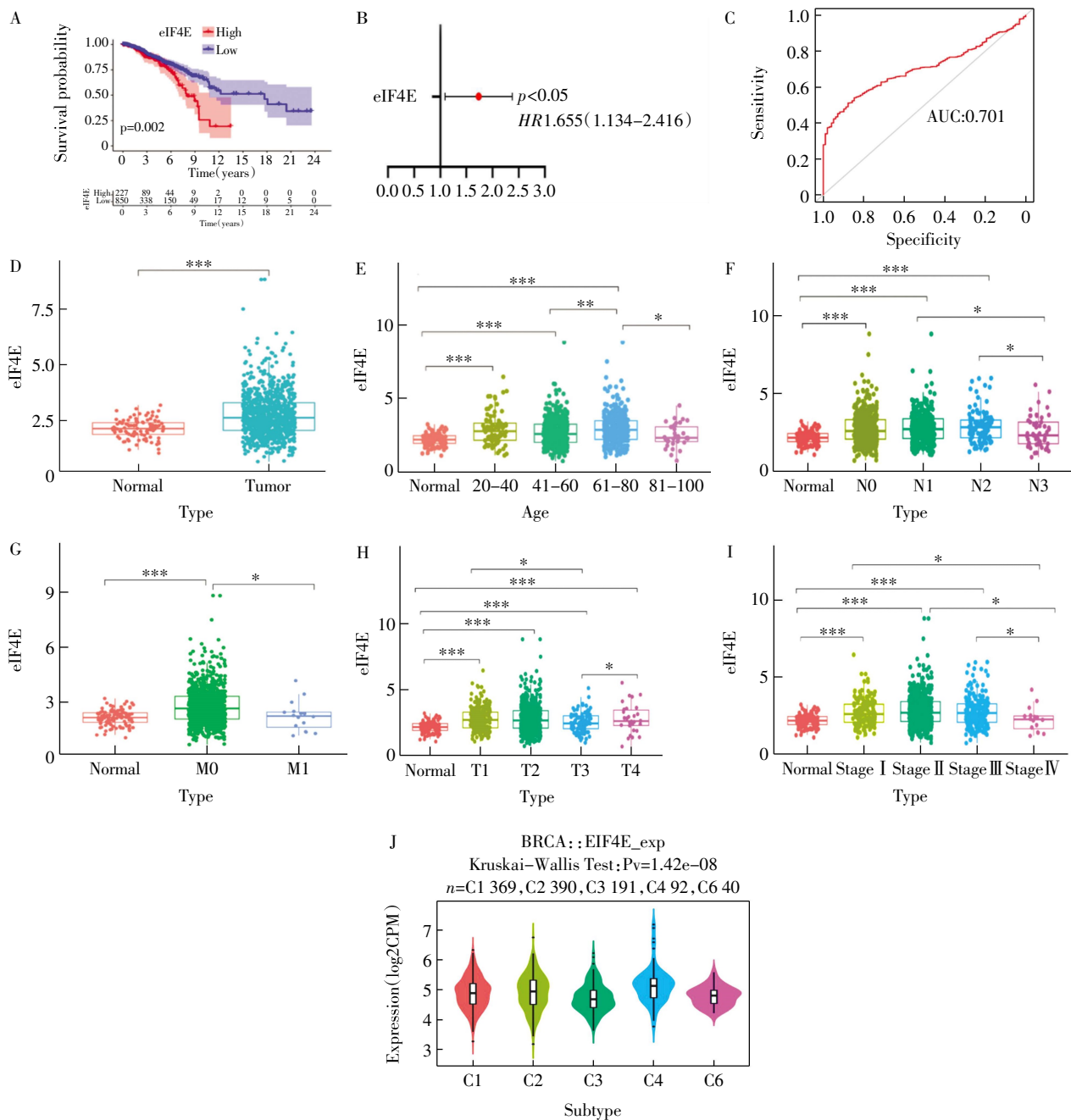
2.3 TCGA 数据库中乳腺癌 eIF4E 表达与免疫细胞浸润水平和免疫标志基因表达的相关性分析 乳腺癌 eIF4E 高表达与低表达组的免疫细胞浸润存在显著差异;在 eIF4E 高表达时, CD8⁺T 细胞、B 细胞、树突状细胞和 Th1 细胞等浸润减少,而免疫抑制细胞 Th2 细胞浸润增加(图 3A~3L, 均 $P < 0.05$)。进一步使用 TIMER 数据库分析乳腺癌 eIF4E 表达与免疫标志分子的相关性,发现其与 CD8⁺T 细胞标记基因 CD8B、B 细胞标记基因 CD19 和树突状细胞标记基因 HLA-DPB1 等呈负相关,而与 Th2 细胞标记基因 GAGT3 和 Treg 标志基因 STAT5B 等呈正相关(3M~3S, 均 $P < 0.05$)。

2.4 乳腺癌 eIF4E 表达和 EMT 的相关性分析 eIF4E 的表达和 EMT-Down 呈负相关(图 4A, $P < 0.05$)。以中位数将 eIF4E 分为高表达组和低表达组。结果发现, eIF4E 高表达时, EMT-Down 表达更低(图 4B, $P < 0.05$)。同时生存分析发现, EMT-Down 高表达时有更好的预后(图 4C, $P < 0.05$)。

2.5 EMT 对乳腺癌免疫细胞浸润影响的分析 EMT-Down 和免疫细胞如 CD8⁺T 细胞、B 细胞、DC 细胞、NK 细胞和 Th1 细胞等浸润呈正相关(图 5A~5L, 均 $P < 0.05$)。根据 EMT-Down 的评分结果以中位数分为两组,发现 EMT-Down 高表达时抗肿瘤免疫细胞浸润明显增多(图 5M, $P < 0.05$)。

2.6 乳腺癌 eIF4E 表达对 EMT 相关蛋白表达和迁移侵袭能力的影响 在 MDA-MB-231 细胞中,SH-eIF4E 处理时上皮标志物 E-cadherin 的表达上升,而间质标记物 Vimentin 的表达下降;相反,在 MCF-7 细胞中,EX-eIF4E 处理导致 E-cadherin 的表达下降,Vimentin 的表达上升(图 6A、6B, $t=11.83$ 、 5.927 、 2.848 、 8.599 ,均 $P<0.05$)。同时免疫荧光实验中,MDA-MB-231-SH-eIF4E 时 E-cadherin 的表达上

升而 Vimentin 的表达下降,MCF-7 细胞中过表达 eIF4E 时 E-cadherin 的表达下降而 Vimentin 的表达上升(图 6C、6D, $t=6.577$ 、 7.843 、 12.48 、 4.406 ,均 $P<0.05$)。迁移实验结果表明,下调 eIF4E 可抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移,而过表达 eIF4E 可促进 MCF-7 细胞的迁移。同样,侵袭试验结果表明,eIF4E 促进了乳腺癌细胞的侵袭能力(图 6E、6F, $t=13.81$ 、 8.9 、 15.27 、 4.954 ,均 $P<0.05$)。



注:A:乳腺癌 eIF4E 表达生存分析;B:乳腺癌 eIF4E 的 Cox 分析;C:乳腺癌 eIF4E 的受试者工作特征曲线;D-J:乳腺癌 eIF4E 表达与肿瘤状态、年龄、Stage 分期、TNM 分期的分析;J:乳腺癌中 eIF4E 表达与免疫亚型的分析(伤口愈合:C1,干扰素- γ 优势;C2,炎症;C3,淋巴细胞减少;C4,转化生长因子- β 优势;C6)

图 1 乳腺癌 eIF4E 表达的预后分析和临床特征

Fig.1 Prognostic analysis and clinical characterization of eIF4E expression in breast cancer

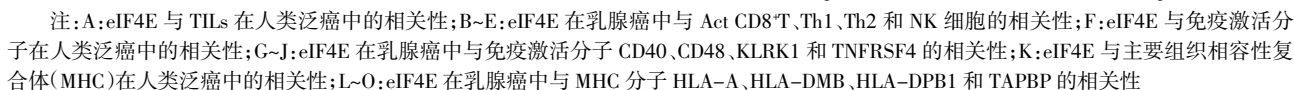
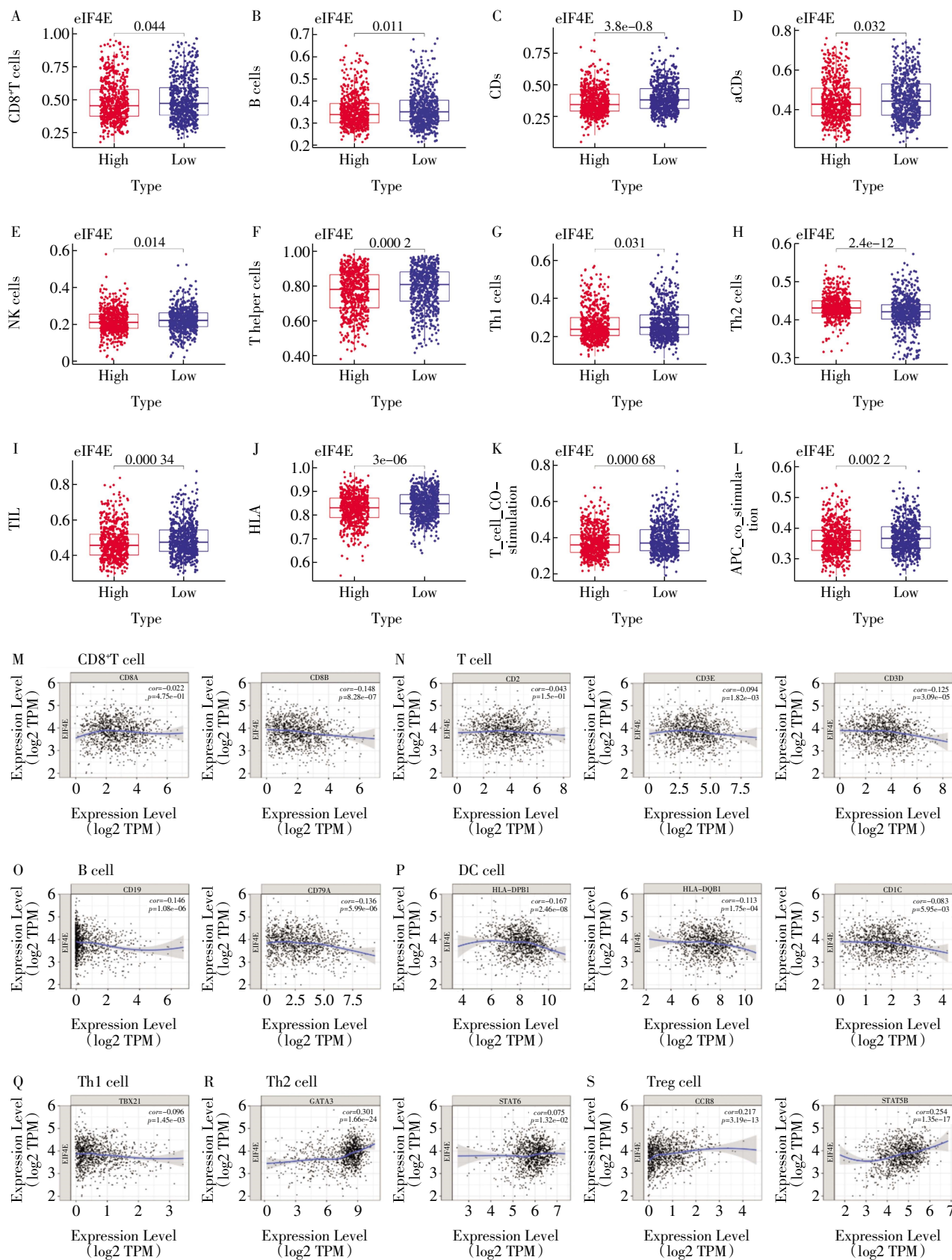


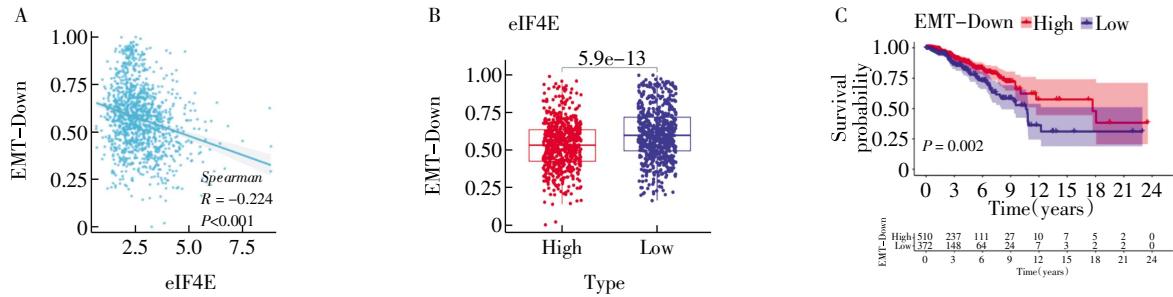
Fig.2 Relationship between eIF4E expression and the abundance of tumor-infiltrating lymphocytes, immune-activating molecules, and major histocompatibility complex molecule expression in human breast cancer tumor tissues



注: A~L: 乳腺癌 eIF4E 高表达和低表达组之间免疫评分的差异表达; M~S: TIMER 数据库中乳腺癌 eIF4E 表达和免疫细胞标志基因的相关性分析

图3 TCGA 数据库乳腺癌 eIF4E 表达和免疫细胞浸润的相关性

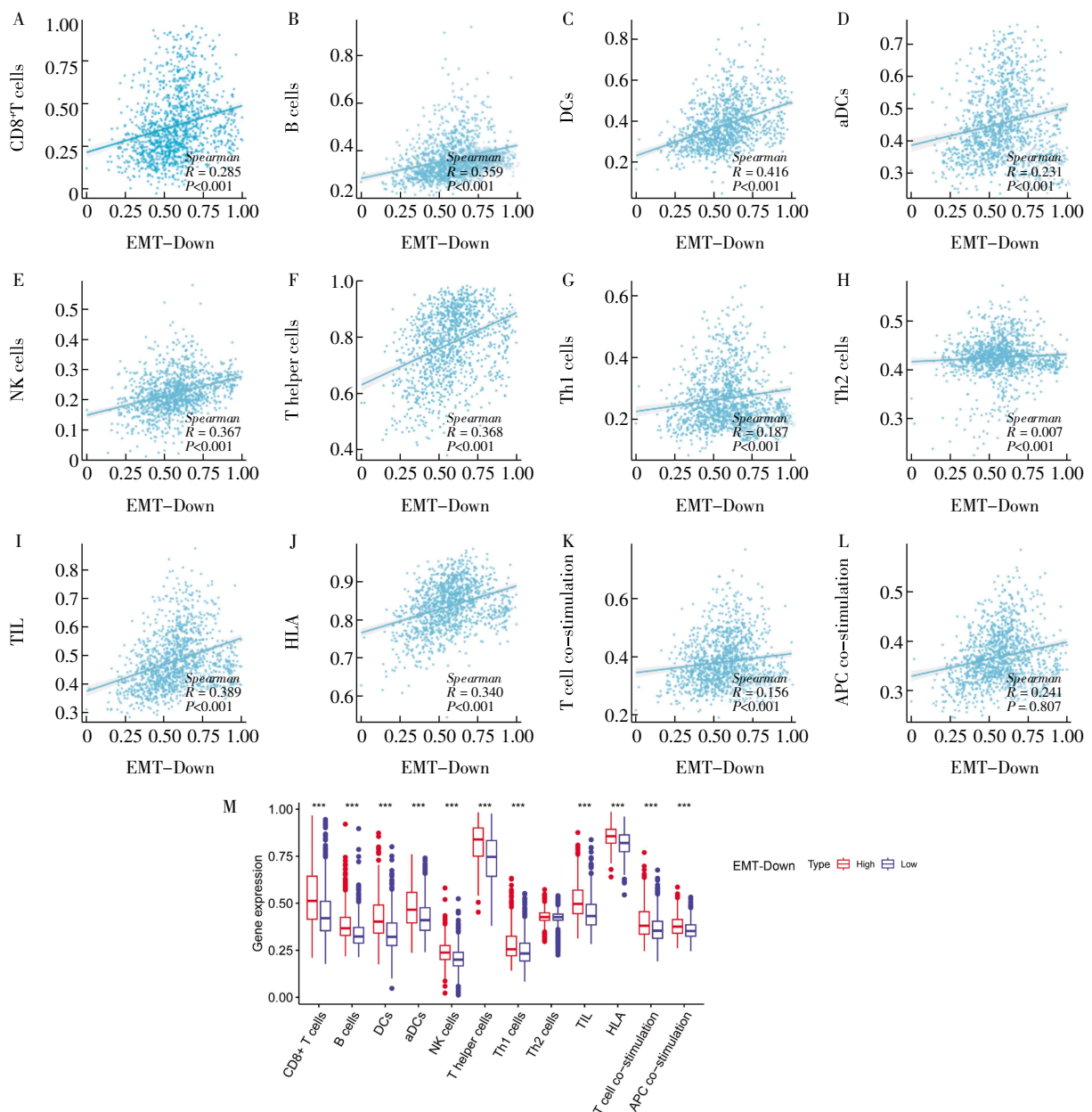
Fig.3 Correlation between eIF4E expression and immune cell infiltration in breast cancer in the TCGA database



注:A:乳腺癌 eIF4E 表达和 EMT-Down 的相关性;B:乳腺癌 eIF4E 高表达组和低表达组间 EMT-Down 的差异表达;C:乳腺癌中 EMT-Down 的生存分析;EMT-Down:上皮-间充质转化抑制基因集

图4 乳腺癌 eIF4E 表达和上皮-间充质转化抑制基因集评分的相关性

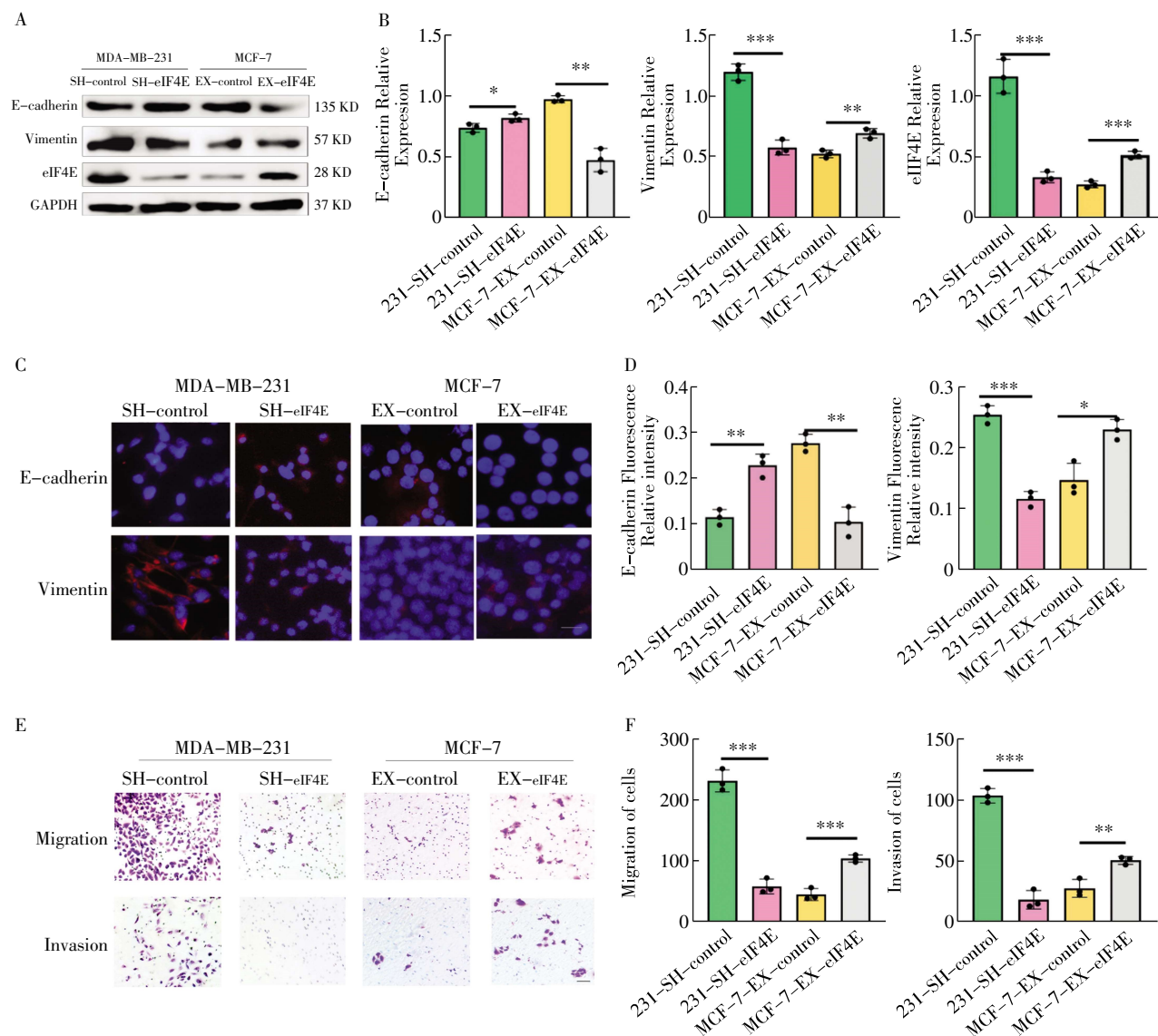
Fig.4 Correlation between eIF4E expression and epithelial-mesenchymal transition inhibitor gene set score in breast cancer



注:A~L:乳腺癌 EMT-Down 和免疫评分的相关性;M:乳腺癌 EMT-Down 高表达和低表达组,不同组别之间免疫评分的差异表达;*** $P < 0.001$;EMT-Down:上皮-间充质转化抑制基因集

图5 乳腺癌上皮-间充质转化抑制基因集评分和免疫浸润的相关性

Fig.5 Correlation between epithelial-mesenchymal transition inhibitor gene set score and immune infiltration in breast cancer



注: A、B: Western 印迹检测 MDA-MB-231-SH-eIF4E、MCF-7-EX-eIF4E 及对照细胞中 EMT 相关标志物的蛋白水平; C、D: 免疫荧光检测 MDA-MB-231-SH-eIF4E、MCF-7-EX-eIF4E 及对照细胞中 EMT 相关标志物的水平, 比例尺 100 μm ; E、F 分别对 MDA-MB-231-SH-eIF4E、MCF-7-EX-eIF4E 和对照细胞进行迁移和侵袭实验, 比例尺 50 μm ; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$

图 6 乳腺癌 eIF4E 表达对 EMT 相关蛋白表达和迁移侵袭能力的影响

Fig.6 Effect of eIF4E expression on EMT-related protein expression and migratory invasion ability in breast cancer

3 讨论

先前研究已指出, 肿瘤免疫细胞高水平浸润与乳腺癌的良好预后相关^[1]。本研究通过数据分析和体外实验, 初步研究了乳腺癌细胞中 eIF4E 蛋白对免疫细胞浸润的影响及其潜在作用机制。结果显示, 乳腺癌中高表达的 eIF4E 可作为不良预后的因素, 其高水平表达会影响 EMT 相关蛋白的表达, 因而促进 EMT 的发生。同时, 这一高水平表达也会抑制抗肿瘤免疫细胞的浸润, 这一过程可能是由于其促进了 EMT 所介导的。

TME 包含许多复杂成分, 免疫细胞在其中发挥抗肿瘤免疫的关键作用。然而 TME 中的一些特征

会导致免疫抑制, 从而限制了抗肿瘤免疫反应。在 TME 中, 免疫抑制的物理屏障可能由内皮细胞的特征改变引起, 这可能限制免疫细胞的活动从而导致免疫浸润减少^[12]。趋化因子表达量的不足可能影响相关免疫细胞的募集, 从而影响免疫细胞的浸润^[13]。此外, 肿瘤细胞上抑制性受体相关配体如免疫检查点 PDL1、CTLA4、LAG-3 和 TIM-3 上调, 表明肿瘤细胞可能通过这种方式抑制免疫细胞的活性来逃避免疫攻击。最后, 抑制性免疫细胞的过度募集可能导致肿瘤免疫反应过程被抑制。这些 TME 的特征共同作用, 有助于肿瘤的逃逸和发展。因此深入理解 TME 的这些特征, 特别是免疫细胞浸润的机

制,对于制定更有效的抗肿瘤治疗策略至关重要。

eIF4E 在蛋白质合成、细胞生长、分化以及肿瘤的发生、发展中发挥重要作用^[14]。通过数据分析笔者发现 eIF4E 高表达时患者预后差,可能在早中期乳腺癌中发挥更重要的作用。同时在乳腺癌的免疫亚型中,eIF4E 在淋巴细胞减少型中表达最高,因此 eIF4E 表达可能会对乳腺癌免疫微环境产生影响。近年来,eIF4E 对肿瘤免疫的作用也有了许多发现。在黑色素瘤中,Cerezo 等^[15]发现,阻断 eIF4E 磷酸化可以重塑免疫微环境,其主要降低树突状细胞和髓源抑制性细胞(MDSC)上 PDL1 的表达以及增加 CD8⁺T 细胞的浸润。胰腺癌 PDL1 的表达和免疫逃逸机制也和 eIF4A/eIF4E 复合物驱动的 mRNA 翻译有关^[16]。前列腺癌中 MDSC 浸润是治疗上的难题,研究表明,丝裂原活化蛋白激酶相互作用激酶(MNK)/eIF4E 通路在诱导 MDSC 浸润中发挥关键作用,抑制该通路可抑制 MDSC 的浸润和肿瘤生长,从而有望重建前列腺癌的免疫监视^[17]。抑制乳腺癌 MNK/eIF4E 通路也可以减少转移并增强抗肿瘤免疫^[18],然而乳腺癌中 eIF4E 表达如何影响免疫细胞浸润及机制仍不清楚。笔者通过数据库分析,观察到在不同类型的肿瘤中,eIF4E 的表达对免疫细胞浸润产生不同影响。在乳腺癌,eIF4E 作为一个预后不良因素,高表达时 CD8⁺T 细胞、B 细胞、NK 细胞、DC 细胞和 Th1 细胞等浸润水平明显低于低表达组,而 Th2 细胞在 eIF4E 高表达时浸润水平高。CD8⁺T 细胞作为最重要的特异性杀伤细胞,在抗肿瘤免疫中至关重要。尽管 B 细胞对肿瘤的功能存在争议,但很多实验证明 B 细胞可能通过产生抗体、抗原呈递、产生细胞因子和趋化因子等途径产生免疫抑制,然而基于单细胞 RNA 测序的结果显示,与外周血相比,肿瘤浸润的 B 细胞更为成熟,同时肿瘤浸润 B 细胞主要为记忆 B 细胞,这些特征与乳腺癌患者生存率的提高显著相关^[19]。此外,McMaster 大学的研究人员发现,经过体外扩增的 NK 细胞可以用于乳腺癌治疗^[20]。然而当 TME 中 Th2 细胞占优势状态,明显多于 Th1 细胞时,机体易发感染和肿瘤,导致肿瘤的免疫逃逸。因此,这些结果证明在乳腺癌中 eIF4E 高表达通过影响免疫细胞浸润造成免疫抑制微环境,从而有利于肿瘤的生长和转移。

利用 ssGSEA 对抑制 EMT 发生的基因集进行评分,笔者发现在乳腺癌中抑制 EMT 的基因高表达时,CD8⁺T 细胞、B 细胞、DC 细胞、NK 细胞和 Th1 细胞的浸润增加,而 Th2 细胞的水平并不升高。已有研究指出,EMT 可能通过招募免疫抑制细胞,如

Treg、MDSCs 和肿瘤相关中性粒细胞(TANs)等,来促进肿瘤发生。这些免疫抑制细胞分泌的因子可能进一步促使 EMT 的发生,从而促进肿瘤的生长和转移,形成一个正反馈循环^[21-22]。同时哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体 1/2(mammalian target of rapamycin complex 1/2,mTORC1/2)抑制剂不仅可以抑制 EMT,还能降低肿瘤细胞表面 PD-L1 的表达,提高肺癌的肿瘤免疫水平^[23]。因此,乳腺癌中的 EMT 可能通过调控抗肿瘤免疫细胞的浸润、招募免疫抑制细胞以及上调肿瘤细胞表面的免疫检查点,从而形成一个免疫抑制的微环境。笔者进一步通过细胞实验发现,乳腺癌中 eIF4E 对 EMT 相关蛋白的表达产生影响,可能促进 EMT 的发生。在 EMT 发生过程中,许多蛋白的表达发生变化。具体而言,E-cadherin 作为上皮细胞的标志性蛋白,其表达受到抑制;而 vimentin 作为间质细胞的标志物,则表达增加。这种转变使得肿瘤细胞从上皮细胞的特征转变为具有间质细胞特征的细胞,该过程增强了肿瘤细胞与原肿瘤块的分离和侵袭性,进而促进了肿瘤的转移^[24]。相关研究证实,抑制 EMT 过程可以减少乳腺癌细胞的迁移和侵袭。Yoshida 等^[25]研究发现,抑制 EMT 过程可以减少乳腺癌细胞的迁移和侵袭。He 等^[26]也证实,通过调控 EMT 过程可以影响乳腺癌细胞的迁移和侵袭程度。因此,正如笔者的实验结果,下调 eIF4E 的表达能够抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭过程,而过表达 eIF4E 则会促进这些过程,这可能是因为乳腺癌中 eIF4E 促进 EMT 过程,进一步促进了乳腺癌细胞迁移和侵袭能力。同时,EMT 过程的发生不仅影响肿瘤的迁移和侵袭,而且增加了肿瘤细胞的增殖^[27]。而 eIF4E 作为蛋白质合成的关键因子之一,有利于 mRNA 的翻译,从而产生致癌因子促进肿瘤细胞增殖^[28]。所以 eIF4E 表达对细胞增殖的影响也可能是由于 eIF4E 的表达促进了 EMT 过程。

综上所述,本研究通过数据分析和体外细胞实验证明了乳腺癌中 eIF4E 的高表达可能会通过促进 EMT 过程而影响免疫细胞的浸润,为进一步研究乳腺癌患者预后的潜在生物标志物和治疗靶点提供了新思路。

参考文献:

- [1] SUNG H,FERLAY J,SIEGEL R L,et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA,2021,71(3): 209-249.
- [2] GAO Y,SAMREEN N,HELLER S L. Non-BRCA early-onset breast cancer in young women[J]. Radiographics,2022,42(1): 5-22.
- [3] MAJIDPOOR J,MORTEZAEI K. The efficacy of PD-1/PD-L1 blo-

- ckade in cold cancers and future perspectives[J]. Clin Immunol (Orlando, Fla), 2021, 226: 108707.
- [4] LI F, SUN H, YU Y, et al. RIPK1-dependent necroptosis promotes vasculogenic mimicry formation via eIF4E in triple-negative breast cancer[J]. Cell Death Dis, 2023, 14(5): 335.
- [5] DONGRE A, WEINBERG R A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(2): 69-84.
- [6] SUN X, WANG M, WANG M, et al. Exploring the metabolic vulnerabilities of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 655.
- [7] JIANG Y, ZHAN H. Communication between EMT and PD-L1 signaling: new insights into tumor immune evasion[J]. Cancer Lett, 2020, 468: 72-81.
- [8] TAKI M, ABIKO K, UKITA M, et al. Tumor immune microenvironment during epithelial-mesenchymal transition[J]. Clin Cancer Res, 2021, 27(17): 4669-4679.
- [9] GONZÁLEZ-MARTÍNEZ S, PÉREZ-MIES B, PIZARRO D, et al. Epithelial mesenchymal transition and immune response in metaplastic breast carcinoma[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(14): 7398.
- [10] CAI J, CUI Y, YANG J, et al. Epithelial-mesenchymal transition: when tumor cells meet myeloid-derived suppressor cells[J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2021, 1876(1): 188564.
- [11] DENKERT C, VON MINCKWITZ G, DARB-ESFAHANI S, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy[J]. Lancet Oncol, 2018, 19(1): 40-50.
- [12] NAMBIAR D K, AGUILERA T, CAO H, et al. Galectin-1-driven T cell exclusion in the tumor endothelium promotes immunotherapy resistance[J]. J Clin Invest, 2019, 129(12): 5553-5567.
- [13] DE CHAISEMARTIN L, GOC J, DAMOTTE D, et al. Characterization of chemokines and adhesion molecules associated with T cell presence in tertiary lymphoid structures in human lung cancer[J]. Cancer Res, 2011, 71(20): 6391-6399.
- [14] LI S, CHEN J S, LI X, et al. MNK, mTOR or eIF4E-selecting the best anti-tumor target for blocking translation initiation[J]. Eur J Med Chem, 2023, 260: 115781.
- [15] CEREZO M, GUÉMIRI R, DRUILLENNEC S, et al. Translational control of tumor immune escape via the eIF4F-STAT1-PD-L1 axis in melanoma[J]. Nature Med, 2018, 24(12): 1877-1886.
- [16] HASHIMOTO S, FURUKAWA S, HASHIMOTO A, et al. ARF6 and AMAP1 are major targets of KRAS and TP53 mutations to promote invasion, PD-L1 dynamics, and immune evasion of pancreatic cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(35): 17450-17459.
- [17] BRINA D, PONZONI A, TROIANI M, et al. The Akt/mTOR and MNK/eIF4E pathways rewire the prostate cancer transcriptome to secrete HGF, SPP1 and BDNF and recruit suppressive myeloid cells[J]. Nature Cancer, 2023, 4(8): 1102-1121.
- [18] GUO Q, BARTISH M, GONÇALVES C, et al. The MNK1/2-eIF4E axis supports immune suppression and metastasis in postpartum breast cancer[J]. Cancer Res, 2021, 81(14): 3876-3889.
- [19] HU Q, HONG Y, QI P, et al. Atlas of breast cancer infiltrated B-lymphocytes revealed by paired single-cell RNA-sequencing and antigen receptor profiling[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 2186.
- [20] NHAM T, POZNANSKI S M, FAN I Y, et al. *Ex vivo*-expanded natural killer cells derived from long-term cryopreserved cord blood are cytotoxic against primary breast cancer cells[J]. J Immunother, 2018, 41(2): 64-72.
- [21] SINGH S, CHAKRABARTI R. Consequences of EMT-driven changes in the immune microenvironment of breast cancer and therapeutic response of cancer cells[J]. J Clin Med, 2019, 8(5): 642.
- [22] ERIN N, GRAHOVAC J, BROZOVIC A, et al. Tumor microenvironment and epithelial mesenchymal transition as targets to overcome tumor multidrug resistance[J]. Drug Resist Updat, 2020, 53: 100715.
- [23] ZHANG Q, ZHANG Y, CHEN Y, et al. A novel mTORC1/2 inhibitor (MTI-31) inhibits tumor growth, epithelial-mesenchymal transition, metastases, and improves antitumor immunity in preclinical models of lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(12): 3630-3642.
- [24] PAOLILLO M, SCHINELLI S. Extracellular matrix alterations in metastatic processes[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(19): 4974.
- [25] YOSHIDA T, OZAWA Y, KIMURA T, et al. Eribulin mesilate suppresses experimental metastasis of breast cancer cells by reversing phenotype from epithelial-mesenchymal transition (EMT) to mesenchymal-epithelial transition (MET) states[J]. Br J Cancer, 2014, 110(6): 1497-1505.
- [26] HE J, CHEN S, YU T, et al. Harmine suppresses breast cancer cell migration and invasion by regulating TAZ-mediated epithelial-mesenchymal transition[J]. Am J Cancer Res, 2022, 12(6): 2612-2626.
- [27] ZHENG Y, JIA H, WANG P, et al. Silencing TRAP1 suppresses cell proliferation and migration/invasion of triple negative breast cancer via RB-E2F signaling and EMT[J]. Cancer Gene Ther, 2023, 30(1): 74-84.
- [28] TSOI H, YOU C P, LEUNG M H, et al. Targeting ribosome biogenesis to combat tamoxifen resistance in ER+ve breast cancer[J]. Cancers (Basel), 2022, 14(5): 1251.

(2024-01-06 收稿)