

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.11.001

View this article at: <https://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2022.11.001>

· 论著 ·

Mcemp1 对三阴性乳腺癌中肿瘤相关巨噬细胞极化状态、增殖及凋亡的影响

白钰明¹, 云芬^{1,2}, 施琳^{1,2}, 贾永峰^{1,2}, 刘霞^{1,2}

(1. 内蒙古医科大学基础医学院, 呼和浩特 010000; 2. 内蒙古医科大学附属医院病理科, 呼和浩特 010000)

[摘要] 目的: 研究肥大细胞表达膜蛋白1(mast cell expressed membrane protein 1, Mcemp1)对三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)中肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)极化状态、增殖及凋亡的影响。方法: 生物学信息分析Mcemp1与肿瘤浸润免疫细胞相关性。构建鼠源性TAMs模型。Real-time RT-PCR验证TAMs模型, 并检测沉默Mcemp1后对TAMs极化状态的影响。活细胞计数法检测沉默Mcemp1对TAMs增殖的影响。流式细胞术检测沉默Mcemp1对TAMs细胞周期及凋亡的影响。结果: 在乳腺癌中Mcemp1的表达与M0型巨噬细胞浸润呈正相关($P < 0.05$)。与单核巨噬细胞RW264.7相比, TAMs中CD206、IL-10的表达均显著升高(均 $P < 0.05$), IL-6、TNF的表达均显著下降(均 $P < 0.05$)。沉默Mcemp1的TAMs中IL-6、CXCL9、CXCL10、IL-10、CD86和TNF的表达均显著上调(均 $P < 0.05$)。沉默Mcemp1的TAMs细胞数在第1、2天时无明显变化(均 $P > 0.05$), 在第3、4天时增多(均 $P < 0.05$)。沉默Mcemp1使得TAMs的S期延长, G₂/M期缩短($P < 0.05$)。沉默Mcemp1的TAMs凋亡率显著下降($P < 0.05$)。结论: Mcemp1在TNBC中TAMs具有免疫抑制的作用, 下调其在TAMs的表达水平, 可促进增殖并同时抑制细胞凋亡。

[关键词] 肥大细胞表达膜蛋白1; 肿瘤相关巨噬细胞; 极化; 增殖; 三阴性乳腺癌

Influence of Mcemp1 on polarization status, proliferation, and apoptosis of tumor-associated macrophages in triple-negative breast cancer

BAI Yuming¹, YUN Fen^{1,2}, SHI Lin^{1,2}, JIA Yongfeng^{1,2}, LIU Xia^{1,2}

(1. Basic Medical College, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010000; 2. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effect of mast cell expressed membrane protein 1 (Mcemp1) on the polarization status, proliferation, and apoptosis of tumor-associated macrophages (TAMs) in triple-negative breast cancer (TNBC). **Methods:** Biological information analysis of Mcemp1 correlation with tumor-infiltrating immune cells.

收稿日期 (Date of reception): 2022-04-08

通信作者 (Corresponding author): 刘霞, Email: 964889319@qq.com

基金项目 (Foundation item): 内蒙古自治区应用技术与开发项目 (2019GG083)。This work was supported by the Inner Mongolia Autonomous Region Applied Technology Research and Development Project, China (2019GG083).

Construction of murine-derived TAMs model. Real-time RT-PCR was used to validate the TAMs model and to detect the effect on the polarization state of TAMs after silencing Mcemp1. Live cell counting assay was used to detect the effect of silencing Mcemp1 on the proliferation of TAMs. Flow cytometry was used to detect the effect of silencing Mcemp1 on the cell cycle of TAMs as well as apoptosis. **Results:** The expression of Mcemp1 in breast cancer was positively correlated with M0-type macrophage infiltration ($P<0.05$). The expression of CD206 and IL-10 was significantly higher in TAMs (both $P<0.05$) and the expression of IL-6 and TNF was significantly lower in TAMs (both $P<0.05$) compared with normal RW264.7 cells. The expression of IL-6, CXCL9, CXCL10, IL-10, CD86, and TNF was significantly upregulated in TAMs with Mcemp1 silencing (all $P<0.05$). The number of cells in TAMs with Mcemp1 silencing did not change significantly at the 1st and 2nd day (both $P>0.05$) and increased at the 3rd and 4th day (both $P<0.05$). Silencing Mcemp1 prolonged the S phase and shortened the G₂/M phase of TAMs ($P<0.05$). The apoptosis rate of TAMs silenced by Mcemp1 was significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** Mcemp1 has an immunosuppressive effect on TAMs in TNBC, and downregulation of its expression level in TAMs promotes proliferation and simultaneously inhibits apoptosis.

Keywords mast cell expressed membrane protein 1; tumor-associated macrophages; polarization; proliferation; triple-negative breast cancer

三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)是一种特殊的乳腺癌亚型, 占所有乳腺癌总数的10%~15%, 其典型特征为孕激素受体(progesterone receptors, PR)、雌激素受体(estrogen receptors, ER)和人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)的表达缺失^[1]。TNBC的侵袭性强、复发率高以及化疗耐药等特点导致其预后不良^[2]。TNBC在肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)中同样具有明显的异质性^[3]。目前, TNBC的发病机制尚不清楚, 靶向治疗药物较少。因此, 深入研究TME, 寻找新的治疗手段, 对TNBC的治疗具有重要意义。

TME主要由肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)、T淋巴细胞、NK细胞、树突状细胞和成纤维细胞组成^[4]。TAMs为TME中主要的浸润性免疫细胞, 约占50%^[5]。其在启动肿瘤发生、血管生成、肿瘤转移、耐药性以及肿瘤免疫抑制方面发挥重要作用^[6]。巨噬细胞主要有2种极化状态, 即由脂多糖和干扰素- γ 诱导的经典的M1型及由IL-4或IL-13诱导的M2型^[7]。M1型TAMs主要标志物为CD86, 其可杀伤肿瘤细胞并分泌IL-6、IL-12、CXCL9、CXCL10及TNF- α 等促炎因子^[8]; M2型TAMs主要标志物为CD163与CD206, 具有抗炎及致癌作用, 其高表达IL-10和TGF- β 等免疫抑制因子^[9]。大多数TAMs表现为M2型, 可促进肿瘤的生长、侵袭和转移, 并与肿瘤的预后密切相关^[10]。CXCL9、CXCL10可作为乳腺癌免

疫治疗的靶点, 因此, 寻找一种可以调控TAMs的极化状态进而影响肿瘤发生发展的分子显得尤为重要。

肥大细胞表达膜蛋白1(mast cell expressed membrane protein 1, Mcemp1)参与调节肥大细胞分化及相关免疫反应机制^[11], 关于Mcemp1在TAMs中的作用尚未有文献报道。本实验采用鼠源性TAMs, 研究Mcemp1对TNBC中TAMs极化状态、增殖及凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞系与试剂

小鼠TNBC细胞4T1和小鼠单核巨噬细胞RW264.7均购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 小干扰Mcemp1(small interfering RNA-Mcemp1, si-Mcemp1)、小干扰阴性对照(small interfering RNA-negative control, si-NC)均购自苏州吉玛生物科技有限公司; 胎牛血清、DMEM高糖培养基、青-链霉素、0.25%胰蛋白酶均购自美国Gibco有限公司; FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix购自北京天根生化科技有限公司; TransZol Up、RNaseA和凋亡试剂盒(Annexin V-FITC/PI)均购自北京全式金生物技术有限公司; 细胞周期试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司; DPBS磷酸盐缓冲液购自北京兰洁柯科技有限公司; LipofectamineTM 3000试剂购自美国Invitrogen有限

公司; PCR引物购自上海生工生物有限公司。

1.2 生物信息学分析 Mccmp1 与肿瘤浸润免疫细胞相关性

从癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库中选取113例正常样本及1 109例乳腺癌样本RNA转录组数据, 采用R4.0.2软件中limma、ggplot2、ggpubr以及ggbxbra分析Mccmp1与乳腺癌中免疫细胞浸润的相关性; 同时运用R4.0.2软件中limma和vioplot根据Mccmp1表达的中位值将1 109例乳腺癌样本分为低表达组与高表达组, 分析22种免疫细胞在其中的浸润情况。

1.3 细胞培养

4T1细胞和RW264.7细胞培养于10%胎牛血清, 1%双抗, 89%DMEM的完全培养基中, 置于37 °C, 5%CO₂的培养箱中。当细胞密度为80%~90%时, 用0.25%胰蛋白酶消化4T1细胞进行传代, 用PBS收集RW264.7细胞进行传代。

1.4 细胞转染

当细胞密度为80%~90%时, 将RW264.7细胞接种于6孔板中, 接种数量以过夜后密度为50%~70%为宜, 分别转染si-Mccmp1、si-NC, 转染完成后将细胞分为3组, 即RW264.7细胞组(对照组)、si-NC细胞组(阴性对照组)与si-Mccmp1细胞组(实验组)。si-RNA序列见表1。

1.5 TNBC 细胞和巨噬细胞的共培养

使用0.4 μm的PET膜于6孔板中进行4T1细胞与RW264.7、si-NC和si-Mccmp1细胞的共培养。上室每孔加入1.5 mL的含有6×10³个4T1的细胞悬液, 下室每孔加入2.6 mL的分别含有1.2×10⁴个RW264.7、si-NC和si-Mccmp1的细胞悬液, 置于37 °C, 5%CO₂的环境共同培养5 d后进行下一步实验。

1.6 Real-time RT-PCR 检测巨噬细胞的免疫表型以及转染效果

使用TransZol Up试剂盒提取RNA; FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix反转录试剂盒进行反转录合成cDNA; 按照PerfectStart Green qPCR SuperMix (+DyeI) real-time RT-PCR试剂盒说明书进行操作, 以cDNA作为模板进行PCR特异性扩增, 反应条件为94 °C 30s预变性, 94 °C 5 s变性, 60 °C 30 s退火和延伸, 40个循环。反应结束后观察PCR溶解曲线及扩增曲线, 记录每个孔的Ct值, 采用2^{-ΔΔCt}表示基因的相对表达量, 引物序列见表2。以正常RW264.7细胞为对照, 采用real-time RT-PCR对共培养5 d后的TAMs进行鉴定, 检测指标为CD206、IL-6、IL-10及TNF; 检测转染24 h后及共培养5 d后Mccmp1在RW264.7细胞上的表达水平; 检测共培养5 d后的TAMs IL-6、IL-10、CD86、CXCL9、CXCL10及TNF的表达情况。

表1 siRNA名称及序列

Table 1 Name and sequence of siRNAs

小干扰RNA	正向序列 (5' to 3')	反向序列 (5' to 3')
si-Mccmp1	GGUUGUACAGAACCAUUAUUT	AUAAUGGUUCUGUACAACCTT
si-NC	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	ACGUGACACGUUCGGAGAATT

表2 引物序列

Table 2 Sequence of primers

引物名称	正向序列 (5' to 3')	反向序列 (5' to 3')
PPIA	CCAAACACAAACGGTCCAGTT	GCTTCCACAATGTCATGCCTTCTT
CD86	TGTGTGTTCTGGAAACGGAGTCAAT	TGCTAGGCTGATTCGGCTTCTTG
IL-10	GACAACATACTGCTAACCGACTCCT	CTGCTCCACTGCCTTGCTCTTAT
TNF	CAGGCGGTGCCTATGTCTC	CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG
CXCL9	GGAGTTCGAGGAACCCTAGTG	GGGATTGTAGTGGATCGTGC
CXCL10	CCAAGTGCTGCCGTCAITTTTC	GGCTCGCAGGGATGAIITCAA
IL-6	AGAGGAGACTTCACAGAGGATACCA	CAITTCACGAIITCCCAGAGAACA
CD206	ATGGATGTTGATGGCTACTGGAGA	GTCTGTTCTGACTCTGGACACTTG

1.7 活细胞计数法检测巨噬细胞增殖

实验分为2组: si-NC细胞组和si-Mcemp1细胞组。上室4T1细胞数量为 6×10^3 个, 下室RW264.7细胞数量为 1.2×10^4 个, 上、下室培养基分别为1.5和2.6 mL, 待第2天细胞贴壁后即可进行测量, 间隔时间为1 d, 共测4次。收集下室细胞后使用细胞计数仪测量细胞数。

1.8 流式细胞术检测 TAMs 周期

共培养5 d后, 使用PBS收集下室的RW264.7细胞、si-NC细胞及si-Mcemp1细胞, 1 100 r/min离心5 min, PBS洗涤2遍。将5 mL冰浴预冷的95%乙醇加入到每个样品中, 充分混匀, 4 °C孵育24 h。1 100 r/min离心5 min, 小心移除上清液。加入5 mL冰浴预冷的PBS, 再次离心, 为避免吸走细胞, 可以残留50 μ L左右的PBS。按照每个样品中加入0.4 mL的染色缓冲液, 15 μ L碘化丙啶染色液及4 μ L RNaseA的配比, 提前配制好适量染色液, 注意配液及染色过程中全程避光。每管样品中加入0.419 mL的碘化丙啶染色液, 充分重悬细胞, 37 °C避光温浴30 min。使用Beckman流式细胞仪检测并分析。

1.9 流式细胞术检测细胞凋亡

共培养5 d后, 用PBS收集RW264.7细胞、si-NC细胞及si-Mcemp1细胞, 1 000 r/min离心4 min。用PBS清洗细胞2次, 条件为1 000 r/min离心4 min。用100 μ L的1 \times Annexin V Binding Buffer重悬细胞, 之后分别加入5 μ L的Annexin V-FITC和PI, 混匀。常温下避光反应15 min。于每个样品中加入400 μ L 1 \times Annexin V Binding Buffer, 避光保存, 1 h内进行流式细胞仪检测, 上机时轻弹管底, 以保证细胞沉淀充分溶解。

1.10 统计学处理

采用Graphpad Prism 7.0软件进行作图, SPSS 22.0统计学软件进行数据分析。正态分布数据以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生物信息学分析结果

在免疫细胞中进行Mcemp1的相关性分析, 结果发现: Mcemp1与M0型巨噬细胞以及CD4激活的记忆性T细胞呈正相关, 与静止期肥大细胞呈负相关($P < 0.05$)。与Mcemp1低表达组相比, Mcemp1高

表达组M0型巨噬细胞的浸润显著增多($P < 0.05$), 幼稚B细胞、浆细胞、CD4激活的记忆性T细胞、CD8阳性T细胞及静止期肥大细胞的浸润均显著减少(均 $P < 0.05$, 图1)。

2.2 TAMs 的鉴定

对TAMs的标志物CD206、IL-10及免疫促进因子IL-6、TNF的real-time RT-PCR检测结果显示: 与正常RW264.7细胞相比, 共培养5 d后的RW264.7细胞中CD206、IL-10的表达均显著升高(均 $P < 0.05$), IL-6、TNF的表达均显著下降(均 $P < 0.05$, 图2)。提示单核巨噬细胞已被诱导为TAMs。

2.2 Mcemp1 的转染效果验证

Real-time RT-PCR结果显示: 与正常RW264.7细胞和si-NC RW264.7细胞相比, 转染后24 h的si-Mcemp1 RW264.7细胞中Mcemp1的表达水平均显著下降(均 $P < 0.05$); 与共培养5 d后的TAMs和si-NC TAMs相比, si-Mcemp1 TAMs中Mcemp1的表达水平均显著下降(均 $P < 0.05$, 图3)。提示Mcemp1在巨噬细胞中沉默成功, 且效率比较稳定, 可以进行后续实验, TAMs各组的细胞形态见图4。

2.3 沉默 Mcemp1 对 TAMs 免疫表型的影响

与TAMs和si-NC TAMs相比, si-Mcemp1 TAMs中的IL-6、CXCL9、CXCL10、IL-10、CD86及TNF的表达均显著上调(均 $P < 0.05$, 图5), 表明沉默Mcemp1后, TAMs的表型向着抑制肿瘤的方向转变。

2.4 沉默 Mcemp1 对 TAMs 细胞增殖的影响

活细胞计数法结果显示: 在第1、2天时, si-NC细胞组与si-Mcemp1细胞组的细胞数均未发生明显变化(均 $P > 0.05$); si-NC细胞组第3、4天的细胞数分别为 $(3.52 \pm 0.09) \times 10^5$ 个/mL、 $(7.79 \pm 0.21) \times 10^5$ 个/mL, si-Mcemp1细胞组第3、4天的细胞数分别为 $(3.79 \pm 0.18) \times 10^5$ 个/mL、 $(9.36 \pm 0.38) \times 10^5$ 个/mL; si-Mcemp1细胞组的细胞数在第3、4天时均高于si-NC细胞组(均 $P < 0.05$, 图6)。在第1、2天细胞数未发生明显变化的原因可能为: 此时RW264.7细胞还未诱导为TAMs, Mcemp1对于RW264.7的增殖作用不明显, 而在第3、4天时细胞数量出现了明显的变化, 提示沉默Mcemp1可能会促进TAMs增殖。

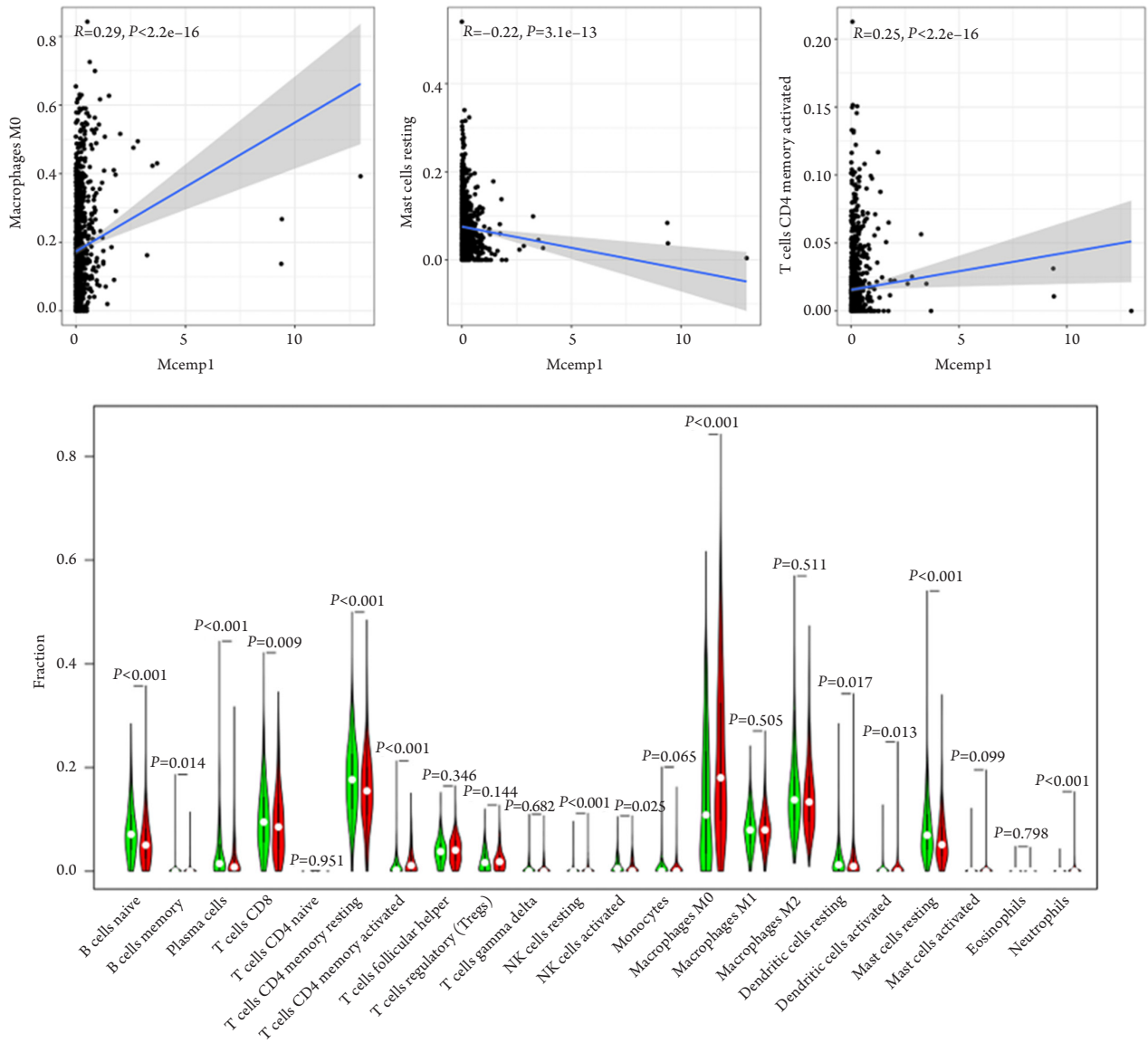


图1 Mcemp1与免疫细胞浸润的相关性
Figure 1 Correlation of Mcemp1 and immune cell infiltration

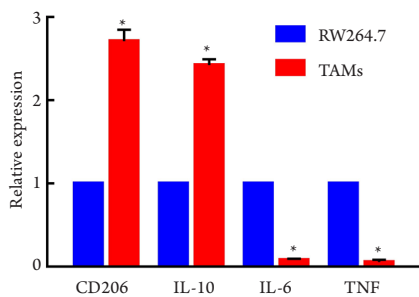


图2 RW264.7与TAMs中CD206、IL-10、IL-6及TNF的表达差异(*P<0.05)
Figure 2 Differences in expression of CD206, IL-10, IL-6, and TNF in RW264.7 and TAMs (*P<0.05)

2.5 沉默 Mcemp1 对 TAMs 细胞周期的影响

细胞周期检测结果显示: si-NC TAMs 的 G₀/G₁期、S期及 G₂/M期细胞比例分别为 (48.45±0.76)%, (25.70±0.94)%, (16.90±1.03)%; si-Mcemp1 TAMs 的 G₀/G₁期、S期及 G₂/M期细胞比例分别为 (48.55±1.21)%, (29.18±1.56)%, (13.87±0.95)%。与 si-NC TAMs 相比, si-Mcemp1 TAMs 的 G₀/G₁期细胞比例未发生明显变化 (P>0.05); si-Mcemp1 TAMs 的 S期细胞比例显著增加 (P<0.05); si-Mcemp1 TAMs 的 G₂/M期细胞比例显著减少 (P<0.05, 图7)。以上实验结果表明沉默 Mcemp1 使得 TAMs 的 S期延长, G₂/M期缩短。

2.6 沉默 Mccmp1 对 TAMs 细胞凋亡的影响

对 si-NC TAMs 和 si-Mccmp1 TAMs 的流式细胞术凋亡结果显示: si-NC 细胞组的凋亡率为 $(25.12 \pm 0.53)\%$, si-Mccmp1 TAMs 的凋亡率为

$(22.24 \pm 1.10)\%$, si-Mccmp1 TAMs 的凋亡率低于 si-Mccmp1 TAMs ($P < 0.05$, 图8)。实验结果表明沉默 Mccmp1 可能对 TAMs 的凋亡产生抵抗作用。

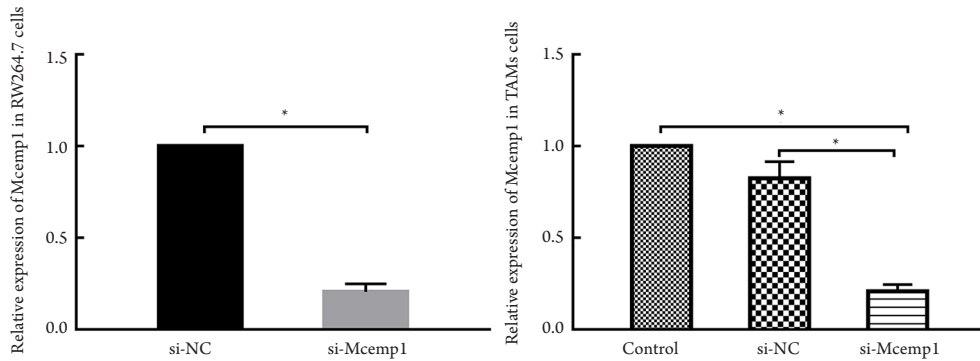


图3 Mccmp1在RW264.7和TAMs中的表达(* $P < 0.05$)

Figure 3 Expression of Mccmp1 in RW264.7 cells and TAMs (* $P < 0.05$)

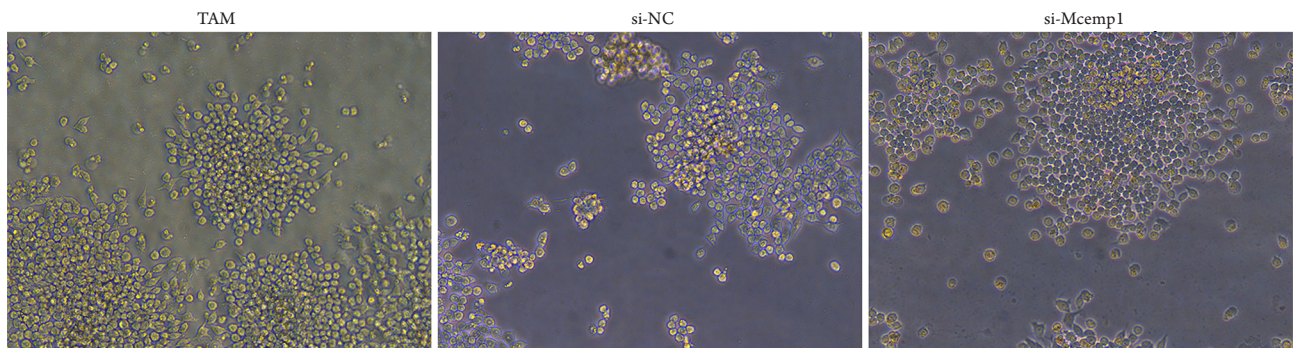


图4 各组TAMs的细胞形态($\times 40$)

Figure 4 Cell morphology of TAMs of each group ($\times 40$)

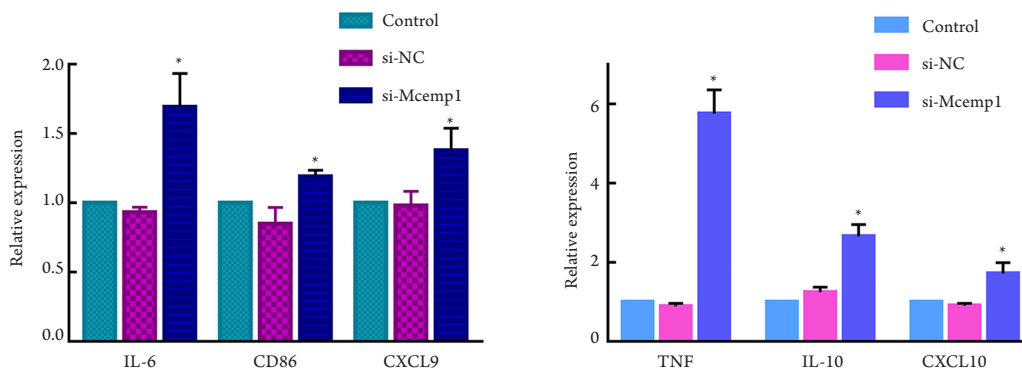


图5 沉默Mccmp1对TAMs中免疫相关基因表达水平的影响(* $P < 0.05$)

Figure 5 Effect of silencing Mccmp1 on the expression level of immune-related genes in TAMs (* $P < 0.05$)

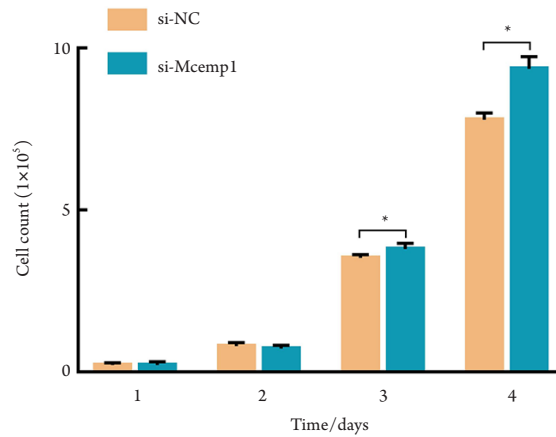


图6 沉默Mcemp1对TAMs增殖的影响(* $P<0.05$)

Figure 6 Effect of silencing Mcemp1 on the proliferation of TAMs (* $P<0.05$)

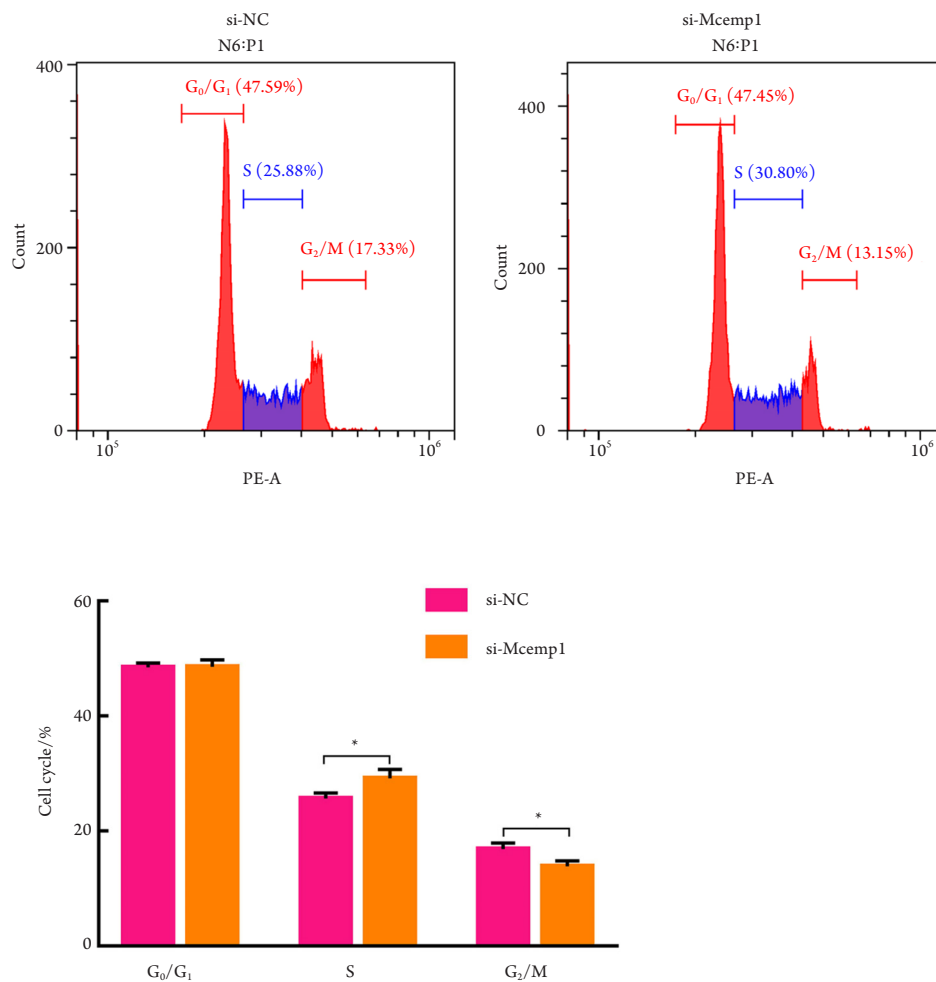


图7 沉默Mcemp1对TAMs细胞周期的影响(* $P<0.05$)

Figure 7 Effect of silencing Mcemp1 on cell cycle of TAMs (* $P<0.05$)

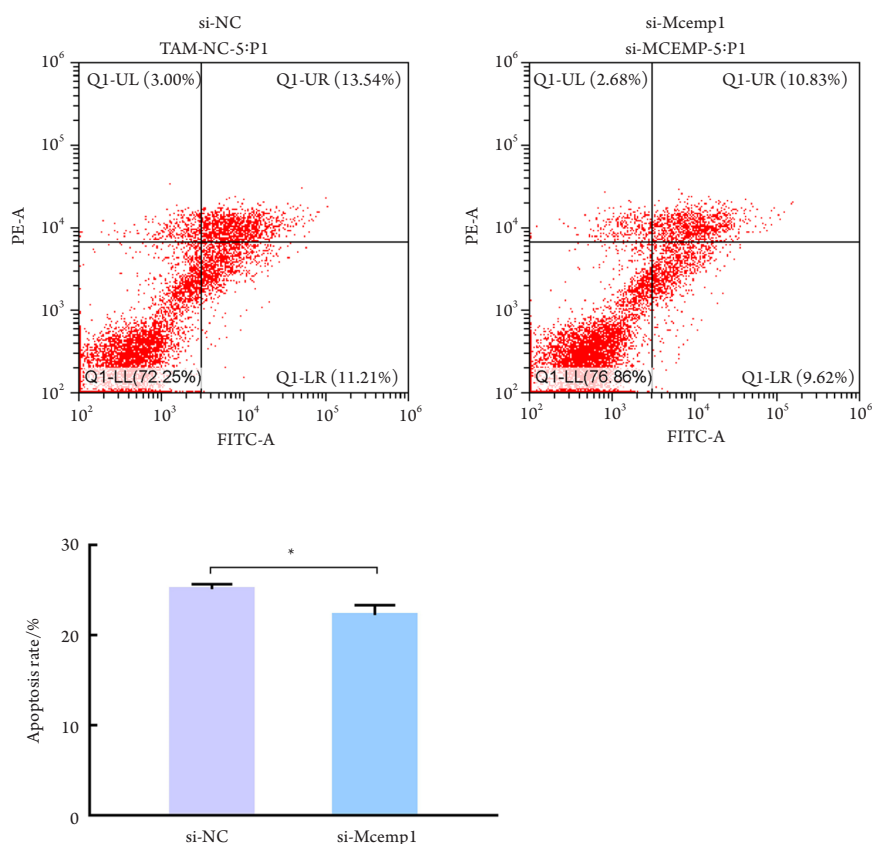


图8 沉默Mcemp1对TAMs凋亡的影响(* $P < 0.05$)

Figure 8 Effect of silencing Mcemp1 on apoptosis of TAMs (* $P < 0.05$)

3 讨论

巨噬细胞起源于骨髓单核细胞, 以未成熟的状态进入血液, 之后从血液迁移到特定部位进一步发育成熟。其功能多样, 包括防御微生物毒性, 吞噬和分泌生长因子、细胞因子、蛋白水解酶等^[12]。根据对外界激活信号的反应, 巨噬细胞可以极化成2个主要表型: 促进炎症的M1型以及抵抗炎症的M2型^[13]。M1型巨噬细胞能够释放多种促炎因子(IL-12、NO、TNF等), 具有较强的抗原提呈能力, 因此其可提高免疫应答, 抑制肿瘤生长; M2型巨噬细胞则可以分泌抗炎因子IL-10、TGF- β 和胶原蛋白等来抑制免疫反应从而促进肿瘤的发展^[14]。

TME由代谢环境中各种类型的细胞组成。血管提供氧气和营养, 并负责清除废物; 基质细胞和免疫细胞通过分泌信号分子和细胞外基质来调节肿瘤生长。

TAMs是TME中主要的免疫细胞, 在肿瘤的生长、转移和耐药中发挥重要作用。高浸润TAMs的乳腺癌、卵巢癌及肺癌等, 往往预示不良预

后^[15]; 然而在某些情况下, 特定的TAMs亚群可能与良好的预后有关^[16]。TAMs通过肿瘤细胞与周围免疫微环境之间的相互作用来影响肿瘤的发生、发展和转移。

TAMs是治疗癌症的理想靶点。对于消耗肿瘤中TAMs的疗法已经得到推广, 但是其对患者的影响却是微乎其微。其原因为TAMs具有可塑性, 在TME中, TAMs既可以促进肿瘤发生、发展, 又可以发挥抵抗肿瘤的作用; 消耗抵抗肿瘤发展的TAMs势必会影响总体疗效^[17]。通过将TAMs重新转化为具有促炎症和抗肿瘤功能的细胞进行治疗是一种有力的治疗手段, 利用TAMs的肿瘤归巢能力和可塑性可以在许多癌症中产生有效及持久的反应, 其中就包括乳腺癌^[18]。

Mcemp1可参与调节肥大细胞分化及相关免疫反应机制^[11]。Raman等^[19]发现外周血Mcemp1基因表达可作为预测卒中预后的生物标志物。此外, Mcemp1还可作为lncRNA NEAT1的靶基因来促进小鼠脓毒症时的免疫反应^[20]。但Mcemp1在TAMs中的作用尚未有研究报道, 本实验首先运用生物学信息方法分析了Mcemp1与免疫细胞的相关性,

结果发现其表达与M0型巨噬细胞呈正相关。乐奇等^[21]通过对胃癌的生物学信息分析显示: Mcomp1的表达水平与M0型巨噬细胞和M2型巨噬细胞比例呈正相关。这与本研究结果相吻合。

本研究构建TAMs模型, 验证结果显示: TAMs中CD206、IL-10的表达水平升高, IL-6、TNF的表达水平下降; TAMs的标志物为CD206、CD163及VEGF等, 而M2型巨噬细胞高表达IL-10, 低表达IL-6及TNF^[22]。提示本实验中构建的TAMs向着免疫抑制的方向发展。本研究采用了化学修饰合成的siRNA来延长转染时间, 并对转染后1和5 d Mcomp1在细胞上的表达进行了测定, 结果显示转染效果较为稳定。随后本研究发现沉默Mcomp1的TAMs中的IL-6、CXCL9、CXCL10、IL-10、CD86及TNF的表达显著上调, 提示Mcomp1可能在TAMs中起免疫抑制的作用。本研究又对沉默Mcomp1的TAMs做了增殖、凋亡的功能实验, 结果发现: 沉默Mcomp1后, TAMs的增殖速度变快, G₀/G₁期缩短, S期延长, 并且凋亡率也有所下降。提示Mcomp1在促进TAMs向抗肿瘤方向发展的过程中同时也促进了TAMs本身在TME中的生存, 更加有利于抗肿瘤作用的发挥。

本实验仍存在一定的局限性: 仅研究了Mcomp1对TAMs本身的生物学功能和免疫表型的影响, 未研究沉默Mcomp1的TAMs对TNBC具体的生物学功能的影响。本研究运用鼠源性细胞进行实验, 仅在转录水平检测Mcomp1的水平, 不足以反映其胞内真实功能, 后续仍需进一步研究其在人源性细胞蛋白上的表达水平, 以求为TNBC的临床治疗提供新的途径。

综上所述, Mcomp1在TNBC中对TAMs具有免疫抑制的作用, 下调其在TAMs中的表达水平, 可促进增殖并同时抑制细胞凋亡。

参考文献

1. Vagia E, Mahalingam D, Cristofanilli M. The landscape of targeted therapies in TNBC[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(4): 916.
2. Rigraciolo DC, Nohata N, Lappano R, et al. IGF-1/IGF-1R/FAK/YAP transduction signaling prompts growth effects in triple-negative breast cancer (TNBC) cells[J]. *Cells*, 2020, 9(4): 1010.
3. Deepak KGK, Vempati R, Nagaraju GP, et al. Tumor microenvironment: challenges and opportunities in targeting metastasis of triple negative breast cancer[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 153: 104683.
4. Xiao Y, Yu D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in

- cancer[J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 221: 107753.
5. Gunaydin G. CAFs interacting with TAMs in tumor microenvironment to enhance tumorigenesis and immune evasion[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 668349.
6. Chen D, Zhang X, Li Z, et al. Metabolic regulatory crosstalk between tumor microenvironment and tumor-associated macrophages[J]. *Theranostics*, 2021, 11(3): 1016-1030.
7. Han S, Wang W, Wang S, et al. Tumor microenvironment remodeling and tumor therapy based on M2-like tumor associated macrophage-targeting nano-complexes[J]. *Theranostics*, 2021, 11(6): 2892-2916.
8. Ardighieri L, Missale F, Bugatti M, et al. Infiltration by CXCL10 secreting macrophages is associated with antitumor immunity and response to therapy in ovarian cancer subtypes[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 690201.
9. Han X, Wei Q, Lv Y, et al. Ginseng-derived nanoparticles potentiate immune checkpoint antibody efficacy by reprogramming the cold tumor microenvironment[J]. *Mol Ther*, 2022, 30(1): 327-340.
10. Yang Y, Guo Z, Chen W, et al. M2 macrophage-derived exosomes promote angiogenesis and growth of pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting E2F2[J]. *Mol Ther*, 2021, 29(3): 1226-1238.
11. Jian R, Yang M, Xu F. Lentiviral-mediated silencing of mast cell-expressed membrane protein 1 promotes angiogenesis of rats with cerebral ischemic stroke[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(10): 16786-16797.
12. Ross EA, Devitt A, Johnson JR. Macrophages: the good, the bad, and the gluttony[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 708186.
13. Lu Y, Liu S, Yang P, et al. Exendin-4 and eldcalcitol synergistically promote osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells through M2 macrophages polarization via PI3K/AKT pathway[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 113.
14. Cui J, Shan K, Yang Q, et al. Eicosanoid production by macrophages during inflammation depends on the M1/M2 phenotype[J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2022, 160: 106635.
15. Wu D, Liu X, Mu J, et al. Therapeutic approaches targeting proteins in tumor-associated macrophages and their applications in cancers[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(3): 392.
16. Johanny LD, Sokumbi O, Hobbs MM, et al. Polarization of macrophages in granulomatous cutaneous T cell lymphoma granulomatous mycosis fungoides microenvironment[J]. *Dermatopathology (Basel)*, 2022, 9(1): 54-59.
17. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, et al. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(7): 399-416.
18. Radharani NNV, Yadav AS, Nimma R, et al. Tumor-associated macrophage derived IL-6 enriches cancer stem cell population and promotes breast tumor progression via Stat-3 pathway[J]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22(1): 122.

19. Raman K, O'Donnell MJ, Czlonkowska A, et al. Peripheral blood MCEMP1 gene expression as a biomarker for stroke prognosis[J]. *Stroke*, 2016, 47(3): 652-658.
20. Chen JX, Xu X, Zhang S. Silence of long noncoding RNA NEAT1 exerts suppressive effects on immunity during sepsis by promoting microRNA-125-dependent MCEMP1 downregulation[J]. *IUBMB Life*, 2019, 71(7): 956-968.
21. 乐奇, 吕坤, 姜雷, 等. 基于生物信息学分析肥大细胞表达膜蛋白1在胃癌中的表达及其与免疫浸润的关系[J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2022, 29(5): 599-606.
- LE Qi, LÜ Kun, JIANG Lei, et al. MCEMP1 expression and its relationship with immune infiltration in gastric cancer: based bioinformatics analysis[J]. *Chinese Journal of Bases and Clinics in General Surgery*, 2022, 29(5): 599-606.
22. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies[J]. *Eur J Immunol*, 2017, 47(10): 1584-1797.

本文引用: 白钰明, 云芬, 施琳, 贾永峰, 刘霞. Mcemp1对三阴性乳腺癌中肿瘤相关巨噬细胞极化状态、增殖及凋亡的影响[J]. *临床与病理杂志*, 2022, 42(11): 2593-2602. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.11.001

Cite this article as: BAI Yuming, YUN Fen, SHI Lin, JIA Yongfeng, LIU Xia. Influence of Mcemp1 on polarization status, proliferation, and apoptosis of tumor-associated macrophages in triple-negative breast cancer[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2022, 42(11): 2593-2602. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.11.001