

林晓晨,龚丽红,郭迎雪,等. MMTV-PyMT 乳腺癌小鼠不同周龄肿瘤微环境中免疫细胞的组成变化 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(7): 935-946.

LIN X C, GONG L H, GUO Y X, et al. Changes in the composition of immune cells in the tumor microenvironment of MMTV-PyMT breast cancer mice at different ages [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(7): 935-946.

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2025.07.001

MMTV-PyMT 乳腺癌小鼠不同周龄肿瘤微环境中免疫细胞的组成变化

林晓晨¹, 龚丽红², 郭迎雪², 金璐², 陈梦芸¹, 王鹏皓¹, 余翠¹,
傅惠英^{1,2,*}, 寿旗扬^{1,2,3}

(1. 浙江中医药大学药学院, 杭州 310053; 2. 浙江中医药大学第二临床医学院, 杭州 310053; 3. 浙江中医药大学金华研究院, 杭州 310053)

【摘要】 目的 研究不同周龄 MMTV-PyMT 乳腺癌转基因小鼠的致瘤特性及肿瘤微环境中免疫细胞的组成变化。方法 准备 8 组在 4、6、8、10、12、14、16、18 周龄的 MMTV-PyMT 雌性小鼠(以 FVB 小鼠为背景)以及 1 组 8 周龄 FVB 雌性小鼠, 对其血常规进行检测, 通过组织病理学切片观察乳腺的病理变化及肺转移情况, 通过流式细胞术分析血液、脾、肿瘤中的免疫细胞。结果 MMTV-PyMT 小鼠 4 ~ 6 周龄时乳腺导管出现腺管样病变, 8 ~ 9 周龄时导管部分长至生长边界, 此后逐渐突破腺体边界, 在 8 ~ 12 周龄时形成早期乳腺癌, 在 10 ~ 14 周龄时出现晚期乳腺癌的特征。在 12 周龄时部分小鼠肺部分出现可见转移病灶, 14 周龄肺部转移灶明显增多; 随着周龄增长, 小鼠血液中白细胞、中性粒细胞、血小板逐渐增多, 而淋巴细胞、红细胞则呈逐渐下降趋势; 流式细胞术提示随着周龄增长, 小鼠脾、肿瘤中 T 细胞比例逐渐下降, 血液、脾、肿瘤中 MDSCs 逐渐增加, 肿瘤中 NK 细胞也逐渐增加。结论 本研究对不同周龄 MMTV-PyMT 小鼠模型的血常规、病理及组织中的免疫细胞进行分析, 为乳腺癌恶性进展过程中肿瘤免疫微环境的动态变化提供新视角。

【关键词】 MMTV-PyMT 转基因小鼠; 乳腺癌; 肺转移; 肿瘤微环境

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 07-0935-12

Changes in the composition of immune cells in the tumor microenvironment of MMTV-PyMT breast cancer mice at different ages

LIN Xiaochen¹, GONG Lihong², GUO Yingxue², JIN Lu², CHEN Mengyun¹, WANG Penghao¹,
YU Cui¹, FU Huiying^{1,2,*}, SHOU Qiyang^{1,2,3}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

2. Second Clinical Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

3. Jinhua Academy of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Corresponding author: FU Huiying. E-mail: fhy131@126.com

【基金项目】 国家自然科学基金(82274175, 82174026), 国家中医药管理局科技司-浙江省中医药管理局共建科技计划项目(GZY-ZJ-KJ-23069)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (82274175, 82174026), Science and Technology Department of State Administration of Traditional Chinese Medicine-Zhejiang Provincial Administration of Traditional Chinese Medicine Co-Construction Project (GZY-ZJ-KJ-23069).

【作者简介】 林晓晨, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药药理肿瘤免疫。Email: 982881326@qq.com

【通信作者】 傅惠英, 女, 博士, 博士生导师, 研究方向: 中药药理肿瘤免疫。Email: fhy131@126.com

[Abstract] Objective This study aimed to investigate the tumorigenic properties of MMTV-PyMT breast cancer transgenic mice at different ages (in weeks) and the changes in the composition of immune cells in the tumor microenvironment. **Methods** Eight groups of 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 and 18 weeks of age MMTV-PyMT female mice (FVB mice as the background) and one group of 8 weeks of FVB female mice were prepared for routine blood testing, the pathological changes of the mammary gland and lung metastases were observed by histopathological sections, and the immune cells in blood, spleen, and tumor were analyzed by flow cytometry. **Results** MMTV-PyMT mice showed adenular ductal lesions at 4 ~ 6 weeks of age; the ductal portion expanded to the growth boundary at 8 ~ 9 weeks of age, and then gradually broke through the glandular boundary to form early breast cancer at 8 ~ 12 weeks of age, and advanced breast cancer at 10 ~ 14 weeks of age. At 12 weeks of age, metastases were visible in the lungs of some mice, and at 14 weeks of age, the number of metastases in the lungs increased significantly. As the age of the mice increased, the number of white blood cells, neutrophils, and platelets in their blood increased gradually, while the lymphocytes and erythrocytes showed a gradual downward trend. Flow cytometry showed that with the increase in age, the proportion of T cells in the spleen and tumor gradually decreased, the MDSCs in the blood, spleen, and tumor gradually increased, and the NK cells in the tumor also gradually increased. **Conclusions** This study analyzed routine blood tests, pathology, and immune cells in the tissues of MMTV-PyMT mouse models of different weeks of age, providing a novel perspective on the dynamic alterations of the tumor immune microenvironment during the malignant progression of breast cancer.

[Keywords] MMTV-PyMT transgenic mice; breast cancer; lung metastases; tumor microenvironment
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一。最新癌症统计数据表明乳腺癌发病率在女性癌症中居于首位^[1]。多项研究已证明,肿瘤介导的免疫重塑对乳腺癌的进展具有重要影响。肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)包括免疫细胞、肿瘤细胞、肿瘤相关成纤维细胞、细胞外基质及周围的血管等多个组成部分,构成了一个复杂的生态系统^[2]。免疫微环境作为肿瘤微环境的一个重要组成部分,随着肿瘤病情的恶化,免疫微环境涉及免疫细胞状态(如具有高度可塑性肿瘤相关巨噬细胞)、群体结构(造血干细胞分化)、运输模型(选择性地招募免疫抑制细胞到转移微环境)以及细胞间的通信网络等各种变化。因此,深入探索乳腺癌发展过程中癌症进展和免疫群体变化特征,有助于为免疫治疗提供更好的靶向策略和个性化治疗方案。

乳腺肿瘤病毒(mouse mammary tumor virus, MMTV)-多瘤病毒中间 T 抗原(polyoma middle T-antigen, PyMT)乳腺癌转基因小鼠,被认为是乳腺癌研究的经典模型^[3]。此种乳腺癌模型经历了原发性肿瘤进展的 4 个典型阶段:增生、腺瘤、早期和晚期癌,同时从癌前病变进展为恶性肿瘤^[4]。相较于其他乳腺癌动物模型,MMTV-PyMT 乳腺癌小鼠表现出疾病进展稳定,6 ~ 8 周龄的

MMTV-PyMT 雌性小鼠会发展出乳腺肿瘤,100% 的肿瘤渗透率,并且 80% ~ 90% 的小鼠会在 14 ~ 16 周龄自发出现肺转移。此外 MMTV-PyMT 小鼠模型在发生、发展过程中,伴随着炎症细胞的浸润及血管形成,有较好的乳腺癌发生发展病理特征和完整的免疫系统,与人类乳腺癌的发展过程极其相似,且具有共同的形态学和转录特征,为研究与乳腺癌进展及转移相关实验提供了可靠的动物模型,这可减少外部环境因素对肿瘤微环境的干扰,有助于乳腺癌原位发展及转移等方面的研究^[4-5]。课题组前期研究了不同性别 MMTV-PyMT 小鼠的成瘤特点及观察不同时间的肺转移,为本研究奠定了实验基础^[6]。因此,以 MMTV-PyMT 乳腺癌小鼠为研究对象,通过观察对不同周龄雌性小鼠肿瘤微环境中免疫细胞的组成变化,为研究乳腺肿瘤的发生、发展、转移以及药物的筛选与治疗方法提供更加明确的思路与方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选取 SPF 级雌性 8 周龄 FVB 小鼠 5 只、雌性 4、6、8、10、12、14、16、18 周龄 MMTV-PyMT 转基因

小鼠各 5 只,共 40 只,4 ~ 12 周龄体质量为 20 ~ 30 g,14 ~ 18 周龄体质量为 30 ~ 50 g。MMTV-PyMT(FVB)转基因小鼠在浙江中医药大学动物实验中心【SCXK(浙)2021-0003】进行保种扩群,品系名称为 FVB/N-Tg(MMTV-PyVT) 634 Mul/J。饲养地点位于浙江中医药大学动物实验中心【SYXK(浙)2021-0012】。饲养的环境温度 20 ~ 25 ℃,湿度 40% ~ 65%,光照为明暗交替 12 h/12 h,自由摄食和饮水,循环通风换气。本动物实验经浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会批准(IACUC-202405-05)。

1.1.2 主要试剂与仪器

Taq 酶、dNTP Mixture、MgCl₂、10 × buffer、DNA marker、6 × loading buffer 等均购于 TaKaRa 公司(批号:AL14607A, AJ30387A, AL14609A, ANF1566A, AN70627A, ALG2456A),琼脂糖粉购于广州赛国生物科技有限公司(批号:EZ7890C447),凝胶核酸染料购于苏州优逸兰迪生物科技有限公司(批号:S2009L),磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)和 RPMI1640 培养基购于赛默飞世尔科技有限公司(批号:8122166,8121353),青霉素-链霉素溶液(100 ×)购于北京兰杰柯科技有限公司(批号:BL505A),红细胞裂解液购于北京索莱宝科技有限公司(批号:BL503B),胎牛血清购于内蒙古大溪生物科技有限公司(批号:DX-1005),流式细胞抗体购于美国 BD 公司(Becton, Dickinson and Company),包括 CD45 PE-Cy7 抗体(批号:0066163)、CD11b AF700 抗体(批号:9289085)、CD11c PE 抗体(批号:1235772)、CD3 FITC 抗体(批号:2293781)、Ly6C APC 抗体(批号:2046641)、Ly6G BV510 抗体(批号:0268376)、NK1.1 BV421 抗体(批号:B249620)、B220 APC-Cy7 抗体(批号:6082703)、CD45 FITC 抗体(批号:1260881)、CD3 BV605 抗体(批号:2094391)、CD4 PE 抗体(批号:2122366)、PD-1 BV421 抗体(批号:7156948)、CTLA-4 APC 抗体(批号:B357148)、CD44 BV510 抗体(批号:B386156)、CD62L PE-Cy7 抗体(批号:1005006)、CD8 APC-Cy7 抗体(批号:1005004)。PCR 仪购于美国 Bio-Rad 公司, Tanon-2500 全自动数码凝胶图像分析仪购于上海天能科技有限公司, Bayer2120 全自动血液细胞分

析仪购于德国西门子公司,流式细胞仪 BD FACSanto 购于美国 BD 公司,ASP200S 全自动脱水机、半自动切片机购于德国 Leica 公司, AP280-2 包埋机购于德国 MICROM 公司, NanoZoomer 2.0 RS 数字切片扫描仪购于日本滨松光子公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠基因型鉴定

选用雄性 8 周龄 MMTV-PyMT(FVB 背景)与雌性成年 FVB 小鼠合笼交配。取 3 周龄小鼠剪尾提取 DNA 后,进行 PCR 扩增,上游引物:5'-GGAAGCAAGTACTTCACAAGGG-3',下游引物:5'-GGAAAGTCACTAGGAGCAGGG-3'。反应条件为:94 ℃ 变性 3 min;94 ℃ 30 s;64 ℃ 1 min;72 ℃ 1 min;35 个循环;72 ℃ 2 min,充分延伸,扩增产物为 556 bp。

1.2.2 动物实验与采样

MMTV-PyMT 转基因小鼠 40 只,为实验组,分为 8 组,每组 5 只,分别为 4、6、8、10、12、14、16、18 周龄及 8 周龄 FVB 小鼠 5 只,为阴性对照组。实验结束后,各组小鼠采用 CO₂ 安乐死后使用心脏穿刺法收集血液于 2 mL 抗凝管中。收集小鼠第一对乳房组织及全肺组织,用 4% 多聚甲醛中固定。从抗凝管中取 100 μL 血液及小鼠脾和肿瘤组织,制备单细胞悬液用于流式细胞术检测。实验流程如图 1 所示。

1.2.3 血常规检测

将肝素钠采集的抗凝血立即使用全自动血液细胞分析仪进行检测,主要检测指标有:白细胞(white blood cell, WBC)计数、中性粒细胞(granulocyte, NUET)计数、淋巴细胞(lymphocyte, LYMPH)百分比、血小板(platelet, PLT)计数、红细胞(red blood cell, RBC)计数。

1.2.4 病理检测

使用无菌器械剥离小鼠第一对乳房组织及全肺组织,将组织置于 PBS 中轻轻清洗,去除血液和残留物。将组织分别置于 4% 多聚甲醛中固定过夜。后使用石蜡包埋,脱蜡和复水后,制作 4 μm 组织切片用苏木素-伊红(HE)染色,再用乙醇梯度脱水,二甲苯透明后用中性树胶封片固定。采用 NanoZoomer 数字切片扫描仪进行扫描,并用 NDP.view 2.0 软件对扫描图像进行病理分析。

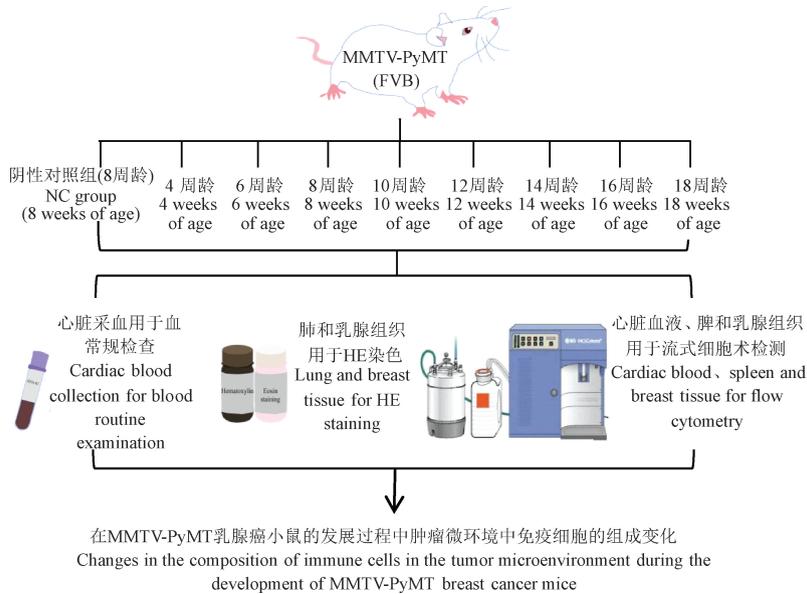


图 1 实验流程

Figure 1 Experimental flow

1.2.5 流式检测

实验开始前配制好所需试剂:MACS 缓冲液(含 2% 灭活的胎牛血清(56 °C 水浴, 30 min)和 1% 青霉素-链霉素的无菌磷酸缓冲盐溶液); Harvest 培养基:含 2% 灭活胎牛血清, 1% 青霉素-链霉素的 RPMI 1640 培养基。

取小鼠血液、脾、肿瘤进行流式细胞术检测免疫细胞亚群变化。将小鼠利用 CO₂ 安乐死后, 取约 0.7 g 肿瘤组织及脾组织, 放置于预冷的 Harvest 培养基中, 使用眼科剪充分将组织剪切成小块, 使用无菌注射器柄轻轻研磨组织, 然后使用 70 μm 尼龙膜过滤, 去除大块组织碎片。后用 2 mL Harvest 培养基冲洗滤膜, 收集滤液, 即为单细胞悬液。加入 3 mL 红细胞裂解液混匀离心(1500 r/min, 5 min)以去除肿瘤组织中的红细胞, 细胞沉淀加入 MACS 缓冲液清洗两次后, 将细胞重悬于 MACS 缓冲液中获得单细胞悬液。将小鼠利用 CO₂ 安乐死后, 取适量小鼠心脏血液于 2 mL 抗凝管中, 取 100 μL 血液于 1.5 mL EP 管中, 加 100 μL 红细胞裂解液, 如上述操作同样制成单细胞悬液。取 200 μL 细胞悬液至 96 孔透明 V 型底微孔板中, 1500 r/min 离心 5 min, 去上清; 使用 MACS 缓冲液清洗 1 次后加入抗体。避光孵育 10 min 后, MACS 清洗 1 次, 加入 200 μL MACS 缓冲液重悬细胞, 转移至流式管中上机检测。使

用流式细胞仪 BD FACSanto 检测并用 FlowJo 10.8.1 软件进行分析。

1.3 统计学分析

实验数据均使用平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 并用 GraphPad Prism 10.1.2 进行统计分析, 两组间比较, 应用独立样本 *t* 检验进行组间分析; 多组间比较, 采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行统计分析, 以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

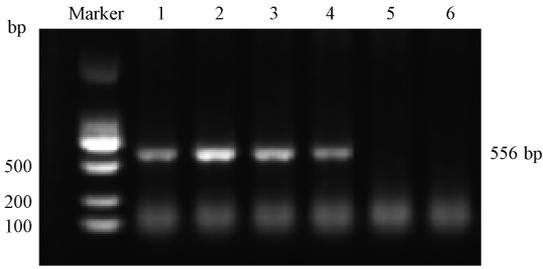
2 结果

2.1 小鼠的基因鉴定结果

经 PCR 扩增后, 加入 2 μL 6 × loading buffer, 混匀, 上样 6 μL 于 1.5% 琼脂糖凝胶上样孔中, 电泳 30 min 后, 结果如图 2 所示, 含有 MMTV-PyMT 基因的实验组小鼠在 556 bp 的位置有条带, 阴性对照组在 556 bp 处无条带。

2.2 不同周龄 MMTV-PyMT 小鼠血常规变化特点

本研究选取 8 周龄阴性对照组小鼠和 4 ~ 14 周龄 FVB 背景的 MMTV-PyMT 雌性小鼠, 通过对小鼠心脏取血检测血常规相关指标发现, 4 ~ 8 周龄小鼠 WBC、NEUT 与阴性对照组相比无明显变化, 在第 10 ~ 14 周龄时 WBC 和 NEUT 显著增加($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.0001$); LYMPH



注:1,2,3,4:实验组;5,6:阴性对照组。

图 2 小鼠基因型 PCR 鉴定

Note. 1, 2, 3, 4. Experimental group. 5, 6. NC group.

Figure 2 Genetic identification of mice by PCR

在第 10 ~ 14 周龄时显著减少 ($P < 0.01, P < 0.0001, P < 0.0001$); RBC 在第 12 ~ 14 周龄时显著减少 ($P < 0.0001, P < 0.0001$); PLT 则在 12 ~ 14 周龄时显著增加 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

2.3 乳腺组织及肺组织形态学变化特征

2.3.1 乳腺组织形态变化特点

乳腺组织 HE 染色结果显示(图 3), 阴性对照组乳腺处于静止期, 乳腺导管上皮细胞排列规则, 管腔无扩张, 小叶及腺泡数较少, 核仁不明显; 4 ~ 6 周龄时, 实验组乳腺脂肪组织中腺泡增

表 1 不同周龄 MMTV-PyMT 小鼠血常规指标变化($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Changes in routine blood indexes of MMTV-PyMT mice at different weeks of age($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别 Groups	WBC/($10^9/L$)	NEUT/($10^9/L$)	LYMPH/%	RBC/($10^{12}/L$)	PLT/($10^9/L$)
阴性对照组 NC group	6.39 ± 0.40	0.66 ± 0.12	88.86 ± 1.45	8.71 ± 0.13	1194.60 ± 37.38
4 周龄 4 weeks of age	5.92 ± 0.36	1.14 ± 0.09	74.64 ± 2.12	7.67 ± 0.24	1018.20 ± 98.30
6 周龄 6 weeks of age	8.25 ± 1.77	1.20 ± 0.19	80.78 ± 1.51	8.45 ± 0.21	1016.20 ± 148.95
8 周龄 8 weeks of age	8.41 ± 2.11	1.26 ± 0.40	77.86 ± 4.98	8.18 ± 0.32	1056.80 ± 55.43
10 周龄 10 weeks of age	10.76 ± 1.42*	2.24 ± 0.40*	71.02 ± 6.62**	8.06 ± 0.20	1253.40 ± 75.07
12 周龄 12 weeks of age	12.56 ± 2.95**	4.55 ± 2.42**	52.16 ± 10.45****	7.38 ± 0.31****	1389.60 ± 67.40*
14 周龄 14 weeks of age	15.80 ± 2.69****	9.79 ± 1.81****	33.30 ± 2.12****	6.47 ± 0.40****	1425.00 ± 88.34**

注:与阴性对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。(下图同)

Note. Compared with NC group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$. (The same in the following figures)

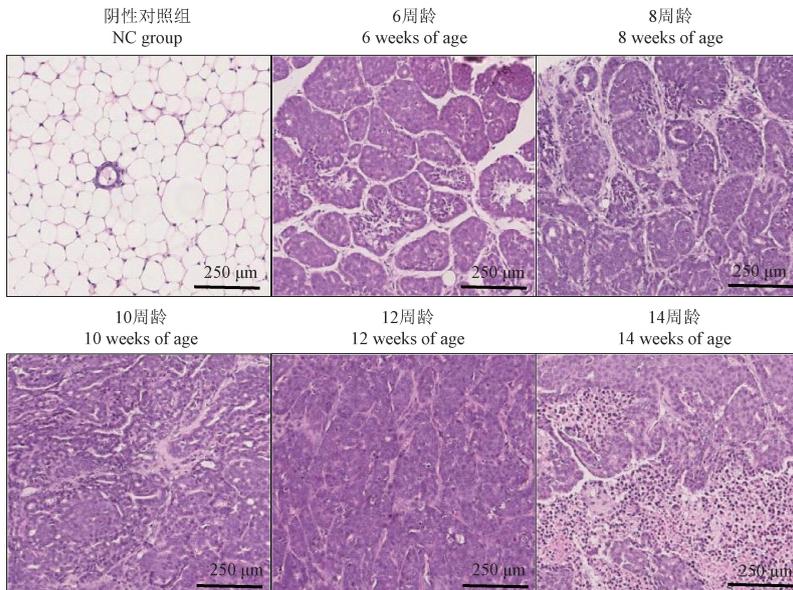


图 3 MMTV-PyMT 小鼠乳腺组织病理学变化(HE 染色, $n = 5$)

Figure 3 Histopathological changes of breast in MMTV-PyMT mice(HE staining, $n = 5$)

生形成密集的乳腺小叶,并逐渐形成腺瘤,细胞体积和细胞核也有增大;8 周龄时小鼠肿瘤细胞继续浸润,出现了明显的乳腺增生,但还未突破腺体边界;10 ~ 12 周龄时,小鼠乳腺组织大量被肿瘤细胞浸润,肿瘤细胞呈现多形性,腺体的轮廓变得不清晰,大部分乳腺小叶结构已难以分辨;至第 12 ~ 14 周龄时,乳腺组织几乎完全被肿瘤细胞浸润,并且因肿瘤组织快速增长,肿瘤组织中心出现细胞皱缩或胀大、染色质凝集或呈絮状等坏死或凋亡表现。图 4 为 MMTV-PyMT 小鼠乳腺组织形态学变化模式图,显示了 MMTV-PyMT 小鼠乳腺病变的 4 个发展阶段。

2.3.2 肺组织形态变化特点

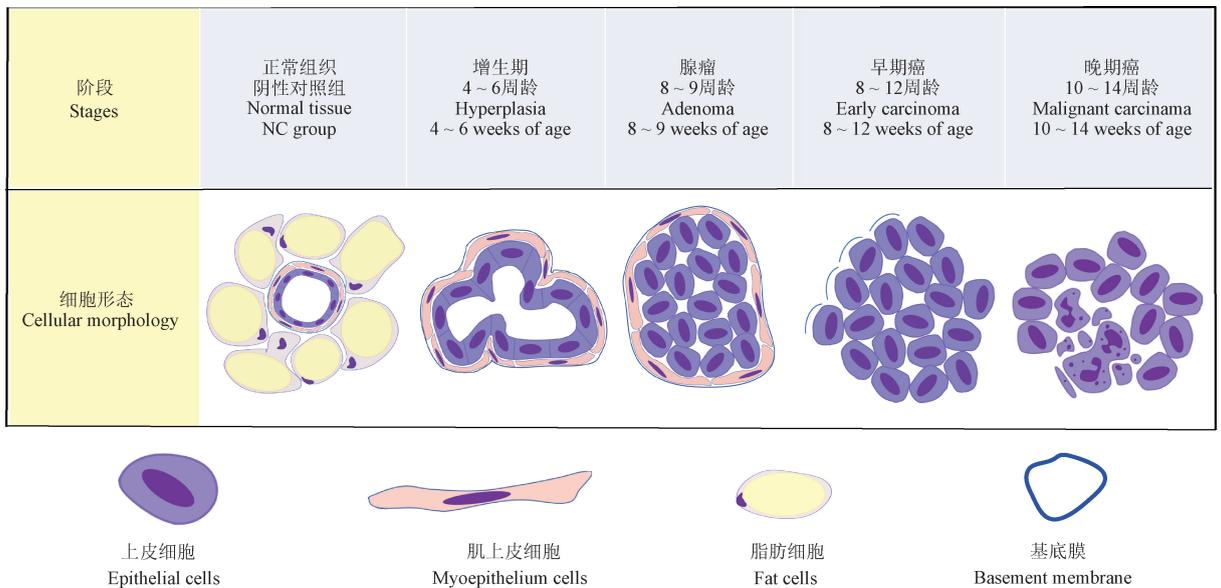
肺组织 HE 染色结果显示(图 5),阴性对照组肺内支气管的上皮主要由单层纤毛柱状上皮构成,肺泡腔为空泡状薄壁结构;MMTV-PyMT 小鼠 4 ~ 10 周龄时肺组织较正常小鼠无明显变化;至第 12 周龄时,小鼠肺部 HE 染色可见细胞核增大、细胞质深染、细胞体积增大。肿瘤细胞从原发部位通过血液循环或淋巴系统迁移至肺部,形成转移灶。图 6 为转移肺结节个数统计。至 14 周龄时,转移灶数量较 12 周龄明显增多,差异具有显著性($P < 0.05$)。16 周龄时肺组织出现严

重的肺转移并伴有弥漫分布的癌巢,表现为非典型增生,由于癌巢的压迫或浸润导致周围组织的结构改变,使导管变窄,细胞形态和大小存在差异,个别情况下可观察到核分裂现象,差异具有显著性($P < 0.001$)。18 周龄时肿瘤细胞进一步恶化和转移,差异具有显著性($P < 0.0001$)。

2.4 MMTV-PyMT 小鼠血液、脾、肿瘤中免疫细胞组成特点

2.4.1 MMTV-PyMT 小鼠不同周龄血液、脾、肿瘤中 T 淋巴细胞的变化规律

流式细胞术检测不同周龄 MMTV-PyMT 小鼠血液、脾、肿瘤中 T 淋巴细胞的变化规律。如图 7 所示,MMTV-PyMT 小鼠与阴性对照组相比,血液中 T 淋巴细胞无明显变化趋势。阴性对照组脾中 $CD4^+$ T 细胞的所占比为(32.00 ± 2.56)%, $CD8^+$ T 细胞的所占比为(12.68 ± 0.94)%。在第 10、12、14 周脾中 $CD4^+$ T 细胞的所占比分别为(26.70 ± 2.07)%、(24.93 ± 4.36)%、(22.63 ± 1.34)%,随着小鼠周龄的增加,脾中 $CD4^+$ T 细胞的比例显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.0001$);在第 12、14 周脾中 $CD8^+$ T 细胞的所占比分别为(7.51 ± 1.04)%、(6.26 ± 0.59)%,随着小鼠周龄的增加,脾中 $CD8^+$ T 细胞的比例显著降

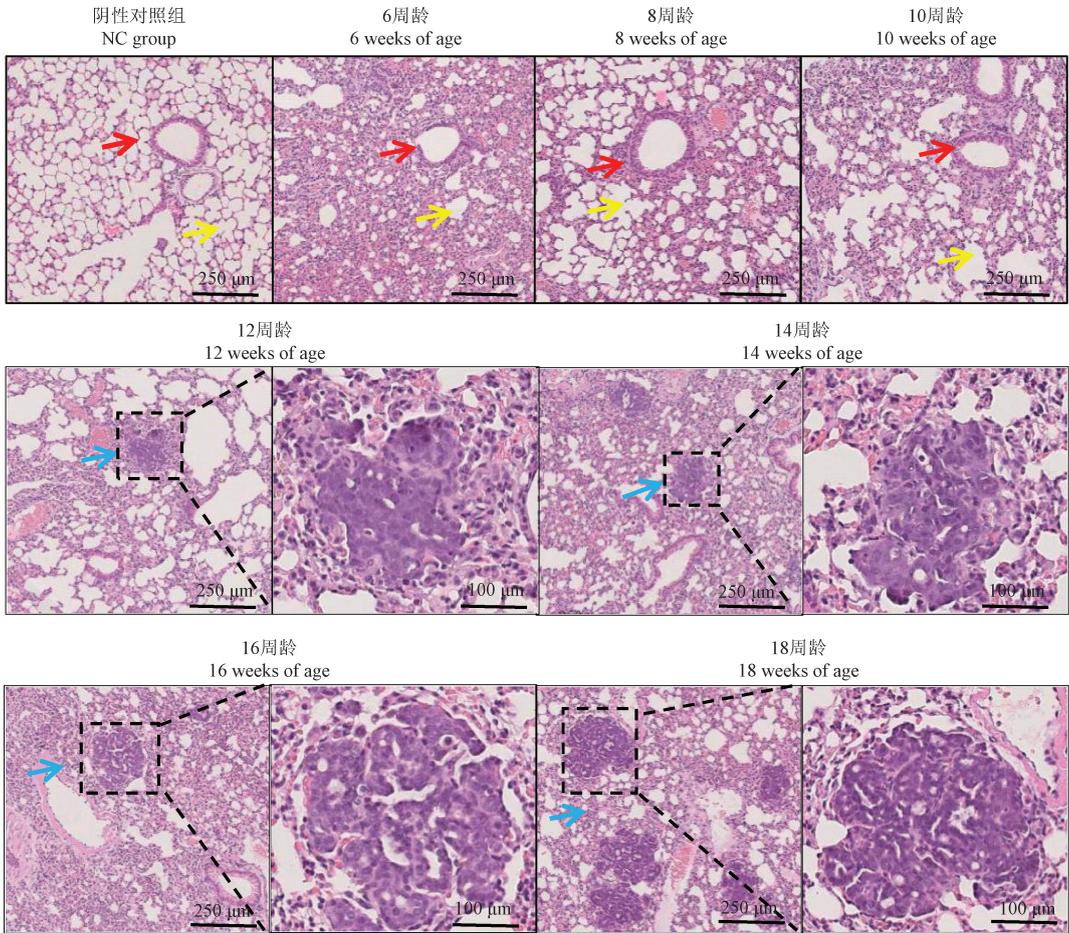


注:与阴性对照组相比,在不同年龄段的转基因 MMTV-PyMT 小鼠和处于不同发育阶段的导管中观察到 4 个肿瘤阶段。

图 4 MMTV-PyMT 小鼠乳腺组织形态学变化模式

Note. Four tumor stages were observed in transgenic MMTV-PyMT mice of different ages and in ducts at different stages of development compared to NC group.

Figure 4 Morphologic pattern of mammary gland in MMTV-PyMT mice

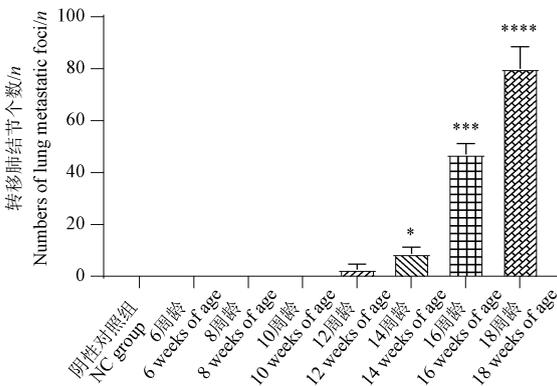


注:红色箭头:气管;黄色箭头:肺泡;蓝色箭头:转移性结节。

图 5 MMTV-PyMT 小鼠肺组织病理学变化(HE 染色, $n = 5$)

Note. Red arrows. Trachea. Yellow arrows. Alveoli. Blue arrows. Metastatic nodules.

Figure 5 Histopathological changes in the lungs of MMTV-PyMT mice(HE staining, $n = 5$)



注:与阴性对照组相比,*** $P < 0.001$ 。(下图同)

图 6 转移肺结节个数($n = 5$)

Note. Compared with NC group, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

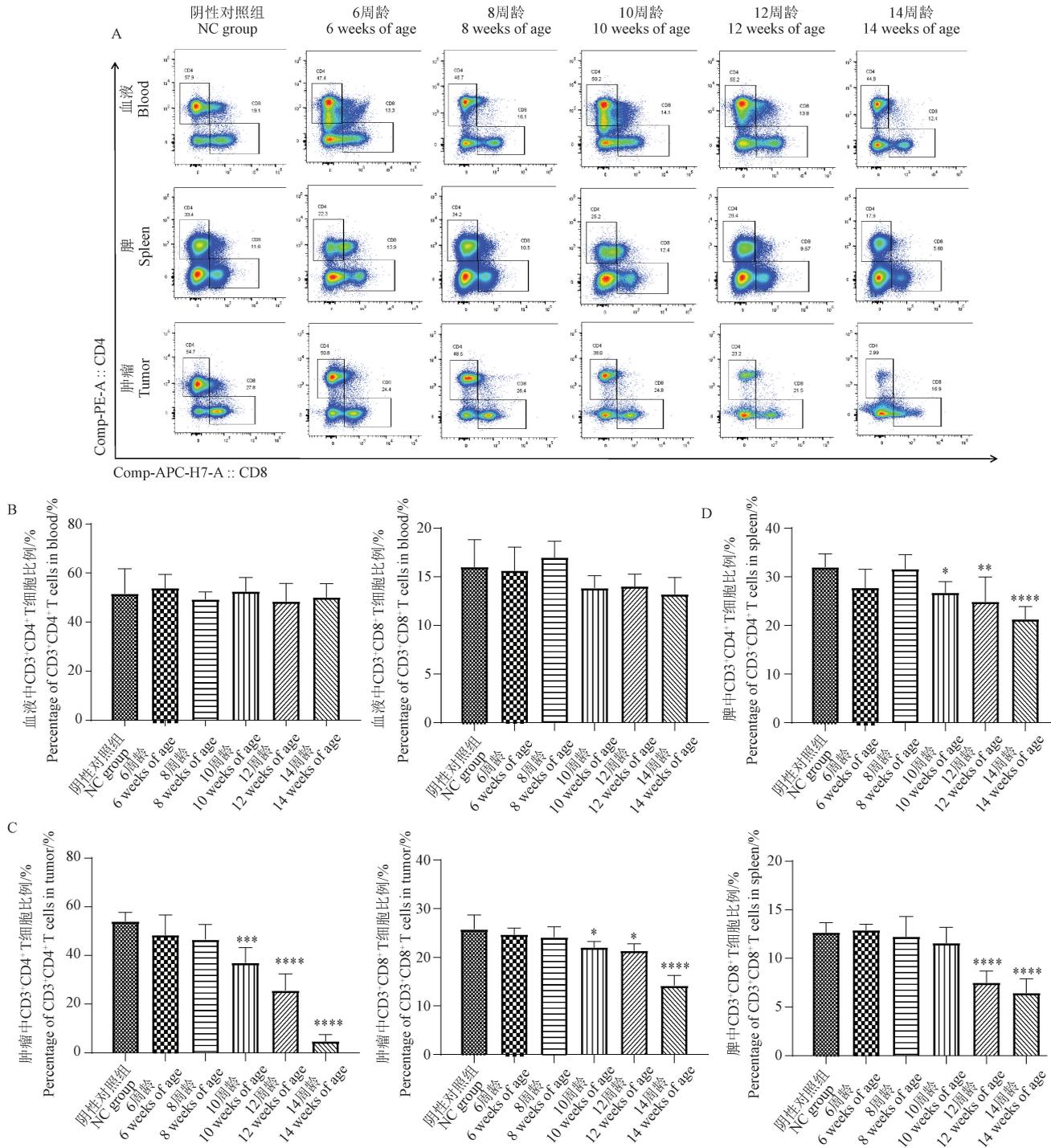
Figure 6 Number of lung metastatic foci($n = 5$)

低($P < 0.0001, P < 0.0001$)。阴性对照组肿瘤中 $CD4^+$ T 细胞占比为(54.10 ± 3.37)%, $CD8^+$ T

细胞所占比为(25.80 ± 2.76)%。在第 10、12、14 周脾中 $CD4^+$ T 细胞的所占比分别为(37.62 ± 5.48)%、(25.65 ± 6.26)%、(4.79 ± 2.35)%,随着小鼠周龄的增加,肿瘤中 $CD4^+$ T 细胞的比例显著降低($P < 0.001, P < 0.0001, P < 0.0001$);在第 10、12、14 周肿瘤中 $CD8^+$ T 细胞的所占比分别为(22.04 ± 1.08)%、(21.38 ± 1.24)%、(14.22 ± 1.86)%,随着小鼠周龄的增加,肿瘤中 $CD8^+$ T 细胞的比例显著降低($P < 0.05, P < 0.05, P < 0.0001$)。

2.4.2 MMTV-PyMT 小鼠不同周龄血液、脾、肿瘤中自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)的变化规律

如图 8 所示,实验组与阴性对照组相比,血液和脾中 NK 细胞无明显变化趋势。阴性对照组肿瘤中 NK 细胞所占比为(0.77 ± 0.48)%,在第



注: A:流式检测阴性对照组与实验组不同周龄血液、脾、肿瘤中 T 淋巴细胞的代表性图片; B:不同周龄小鼠血液中 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞比例统计图; C:不同周龄小鼠肿瘤中 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞比例统计图; D:不同周龄小鼠脾中 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞比例统计图。

图 7 MMTV-PyMT 小鼠不同周龄血液、脾、肿瘤中 T 淋巴细胞的变化规律($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Note. A. Representative images of T lymphocytes in blood, spleen and tumor of NC group and experimental group at different ages by flow cytometry. B. Statistical chart of the proportion of CD4⁺ T and CD8⁺ T cells in the blood of mice of different weeks of age. C. Statistical chart of the proportion of CD4⁺ T and CD8⁺ T cells in the tumor of mice of different weeks of age. D. Statistical chart of the proportion of CD4⁺ T and CD8⁺ T cells in the spleen of mice of different weeks of age.

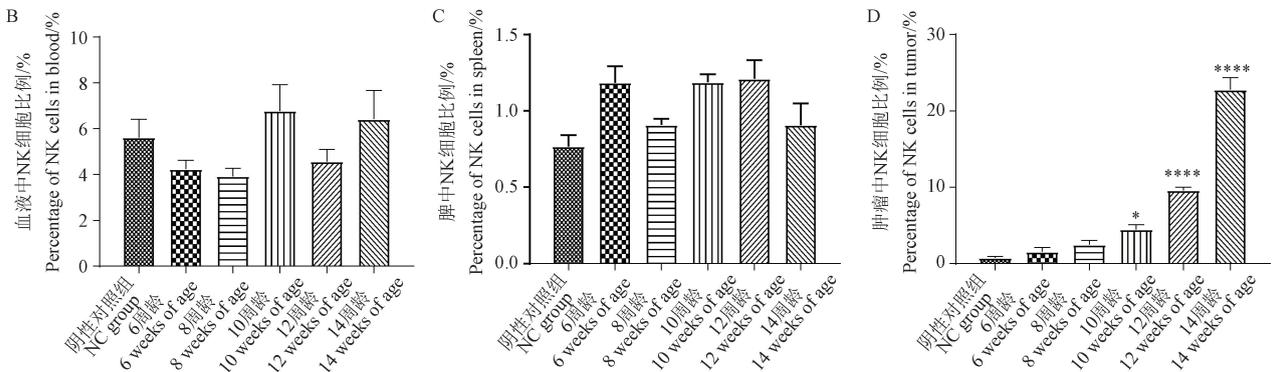
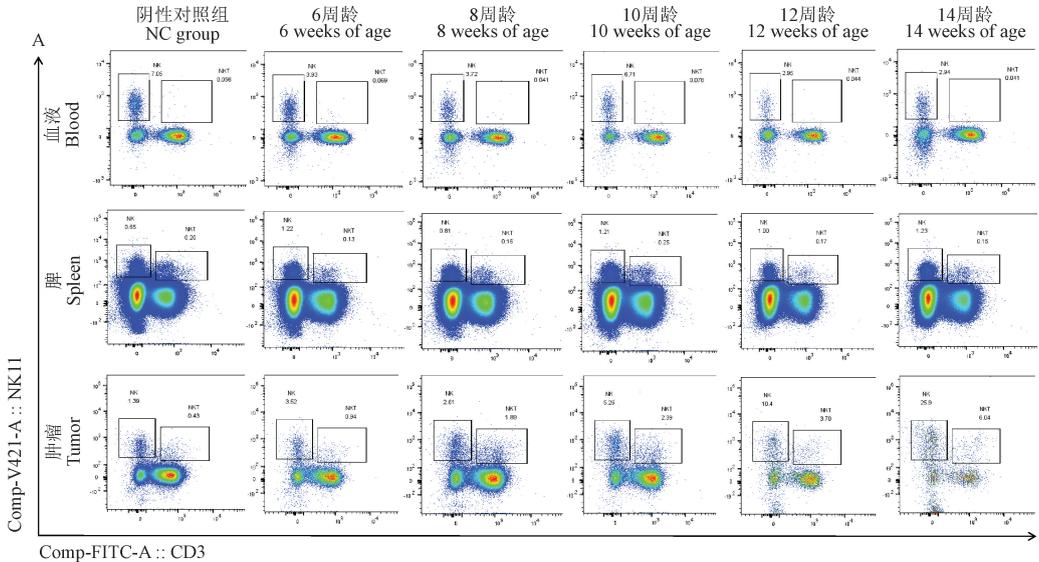
Figure 7 Changes of T lymphocytes in blood, spleen and tumor of MMTV-PyMT mice at different ages ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

10、12、14 周肿瘤中 NK 细胞所占比例分别为 $(4.45 \pm 1.29)\%$ 、 $(9.61 \pm 0.58)\%$ 、 $(22.80 \pm 2.20)\%$ 。随小鼠周龄的增加,肿瘤中 NK 细胞的比例显著增加 $(P < 0.05, P < 0.0001, P < 0.0001)$ 。

2.4.3 MMTV-PyMT 小鼠不同周龄血液、脾、肿瘤中骨髓源性抑制细胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs) 的变化规律

如图 9 所示,实验组与阴性对照组相比,阴性对照组血液中 MDSCs 细胞的所占比例为 $(21.14 \pm 1.95)\%$,在 12、14 周血液中 MDSCs 细胞的所占比例分别为 $(34.18 \pm 5.19)\%$ 、 $(43.05 \pm 1.72)\%$,随着小鼠周龄的增加,血液中 MDSCs 细胞的比例

显著增加 $(P < 0.05, P < 0.0001)$ 。阴性对照组脾中 MDSCs 细胞的所占比例为 $(29.73 \pm 2.51)\%$,在 12、14 周脾中 MDSCs 细胞的所占比例分别为 $(62.63 \pm 10.04)\%$ 、 $(78.60 \pm 5.12)\%$,随着小鼠周龄的增加,脾中 MDSCs 细胞的比例显著增加 $(P < 0.0001, P < 0.0001)$ 。阴性对照组肿瘤中 MDSCs 细胞的所占比例为 $(17.15 \pm 3.06)\%$,在 10、12、14 周肿瘤中 MDSCs 细胞的所占比例分别为 $(27.77 \pm 1.04)\%$ 、 $(26.87 \pm 2.17)\%$ 、 $(28.61 \pm 3.17)\%$,随着小鼠周龄的增加,肿瘤中 MDSCs 细胞的比例显著增加 $(P < 0.01, P < 0.01, P < 0.001)$ 。

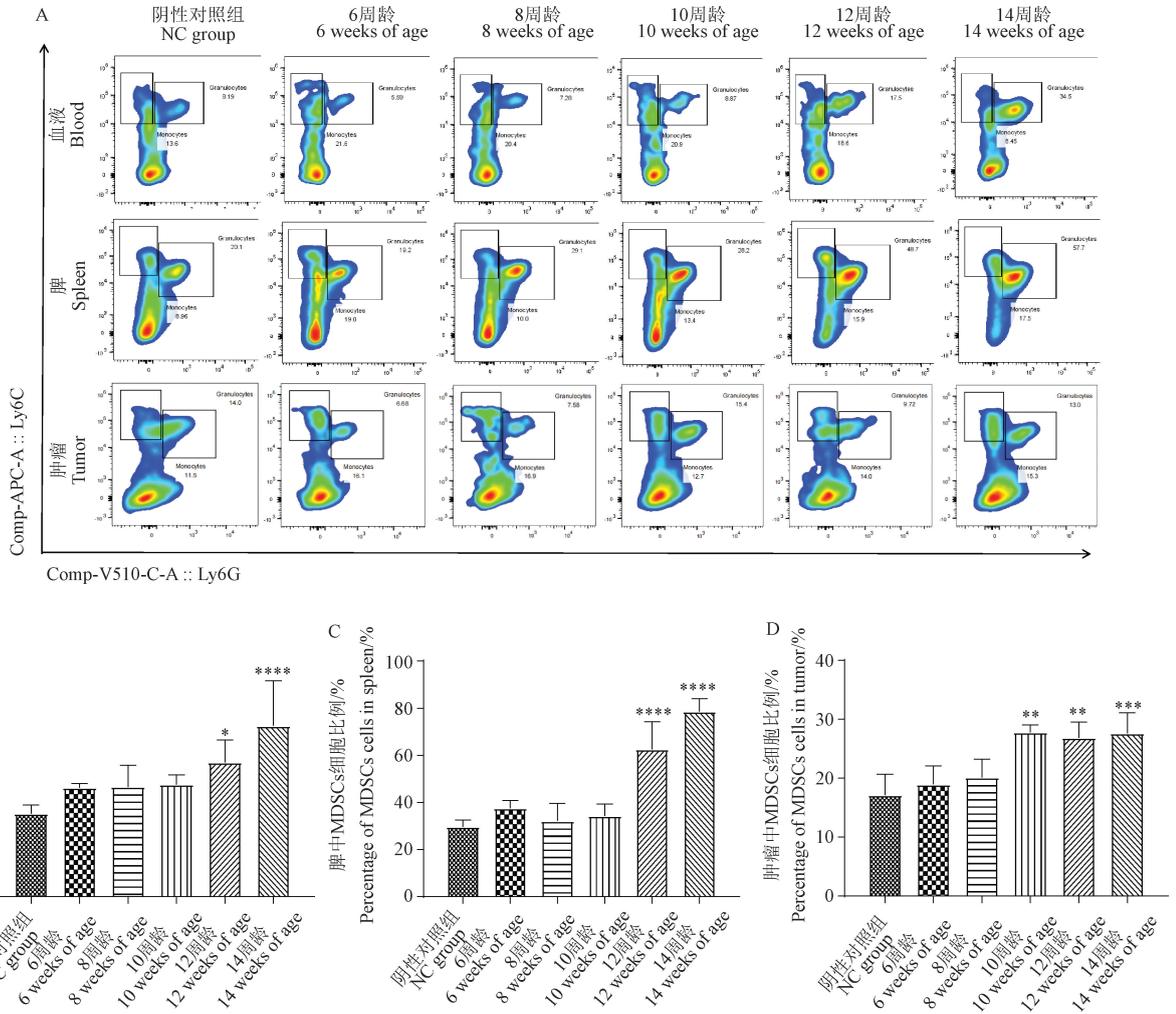


注: A: 流式检测阴性对照组与实验组不同周龄血液、脾、肿瘤中 NK 细胞的代表性图; B: 不同周龄小鼠血液中 NK 细胞比例统计图; C: 不同周龄小鼠脾中 NK 细胞比例统计图; D: 不同周龄小鼠肿瘤中 NK 细胞比例统计图。

图 8 MMTV-PyMT 小鼠不同周龄血液、脾、肿瘤中 NK 细胞的变化规律 $(\bar{x} \pm s, n = 5)$

Note. A. Representative images of NK cells in blood, spleen and tumor of NC group and experimental group at different ages by flow cytometry. B. Statistical chart of the proportion of NK cells in the blood of mice of different weeks of age. C. Statistical chart of the proportion of NK cells in the spleen of mice of different weeks of age. D. Statistical chart of the proportion of NK cells in the tumor of mice of different weeks of age.

Figure 8 Changes of NK cells in blood, spleen and tumor of MMTV-PyMT mice at different ages $(\bar{x} \pm s, n = 5)$



注:A:流式检测阴性对照组与实验组不同周龄血液、脾、肿瘤中 MDSCs 细胞的代表性图;B:不同周龄小鼠血液中 MDSCs 细胞比例统计图;C:不同周龄小鼠脾中 MDSCs 细胞比例统计图;D:不同周龄小鼠肿瘤中 MDSCs 细胞比例统计图。

图 9 MMTV-PyMT 小鼠不同周龄血液、脾、肿瘤中 MDSCs 细胞的变化规律($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Note. A. Representative images of MDSCs cells in blood, spleen and tumor of NC group and experimental group at different ages were detected by flow cytometry. B. Statistical chart of the proportion of MDSCs cells in the blood of mice of different weeks of age. C. Statistical chart of the proportion of MDSCs cells in the spleen of mice of different weeks of age. D. Statistical chart of the proportion of MDSCs cells in the tumor of mice of different weeks of age.

Figure 9 Changes of MDSCs cells in blood, spleen and tumor of MMTV-PyMT mice at different ages($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3 讨论

乳腺癌的自然病史包括经过明确的病理和临床阶段的进展,癌症发展过程涉及多个阶段,从导管或小叶过度增生开始,逐渐演变为原位癌和浸润癌,最终发展为转移性疾病^[7]。本研究记录并观察了乳腺癌 MMTV-PyMT 转基因雌性小鼠不同周龄肿瘤的发生、发展和转移情况。MMTV-PyMT 小鼠发病过程分为 4 ~ 6 周龄乳腺增生期,8 ~ 9 周龄腺瘤期,8 ~ 12 周龄早期癌以及 10 ~ 14 周龄晚期癌 4 个阶段。课题组前期发现雌性

小鼠肿瘤细胞在 12 周龄侵入肺部,到 16 周龄时已能检测到明显的肺转移^[6]。本研究对 6 ~ 18 周龄小鼠肺部进行病理切片,揭示了肿瘤从局部侵袭到远处转移的病理变化,与课题组前期研究结果一致。为研究肿瘤转移和抗转移治疗提供了重要依据。

血液中的 WBC 共有 5 种,即单核细胞、淋巴细胞、NEUT、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞。WBC 可以反映人类机体炎性状态,炎症反应的特征是循环中性粒细胞水平升高,同时循环淋巴细胞水平下降^[8-9]。NEUT 是白细胞中主要抵御病

原体的细胞,在人体免疫系统中起着至关重要的作用,其细胞数量和功能的变化可反映疾病进程,病情严重时,NUET 呈快速上升的趋势。本实验血常规检测中发现,雌性 MMTV-PyMT 小鼠随着周龄的增加,WBC 及 NUET 数量从第 10 周时开始呈上升趋势,明显高于阴性对照组,提示肿瘤相关炎症反应加剧。淋巴细胞在体内抗肿瘤免疫反应中担任关键角色,能够阻止肿瘤细胞的增殖和转移^[10]。在癌症患者中,淋巴细胞数量低与免疫系统的广泛抑制有关,并且往往与较差的预后有关^[11]。血常规结果显示,淋巴细胞计数从第 10 周时开始呈下降趋势,提示免疫抑制,导致小鼠局部免疫力的下降,造成了有利于肿瘤生长的免疫受损环境。肿瘤相关性贫血(cancer-related anemia, CRA)主要是指在肿瘤发展过程中发生的贫血,是恶性肿瘤的常见并发症之一,肿瘤继发性贫血和恶性肿瘤侵入正常组织导致失血,骨髓浸润抑制红细胞生成或炎症导致功能性缺铁密切相关^[12]。血常规结果显示,小鼠在 12 周龄时开始出现贫血情况,此时已为 MMTV-PyMT 小鼠肿瘤发展末期,并且贫血情况随着肿瘤进展进一步加重。血小板的增多与恶性肿瘤发展密切相关,研究发现,恶性肿瘤患者常伴有血小板增高的现象,尤其是在肿瘤晚期,血小板的数量会显著上升。现已有众多证据证实肿瘤细胞进入血液后会激活凝血系统,通过纤维蛋白和活化血小板的黏附,形成癌栓,从而促进了肿瘤细胞的转移和扩散^[13],同时阻断 NK 细胞与肿瘤细胞的直接接触,削弱了机体的抗肿瘤免疫反应。癌栓过程中,血小板促循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs)上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transitions, EMT)是形成新肿瘤病灶的重要机制^[14]。实验研究发现,在第 12 周时,小鼠血小板随肿瘤的发展而升高,提示肿瘤相关血栓形成,同时 HE 观察肺转移灶出现。

肿瘤微环境与肿瘤细胞间的相互作用是一个复杂而动态的过程,其中免疫细胞以 T 淋巴细胞为主发挥着关键作用^[15-16]。在健康状态下,T 淋巴细胞能够识别并清除肿瘤细胞。然而,在肿瘤微环境中,T 淋巴细胞的功能可能受到抑制,导致免疫逃逸。本实验通过流式细胞术对不同周龄 MMTV-PyMT 雌性小鼠的脾、血液、肿瘤中的 T

淋巴细胞分析后发现,随着小鼠的年龄增长,小鼠免疫微环境中 T 淋巴细胞比例下降提示免疫微环境中细胞免疫抑制程度增加,免疫屏障功能受损,从而促进肿瘤的生长和转移。NK 细胞是免疫系统的重要组成部分,可清除多种肿瘤细胞和异常细胞。在肿瘤微环境中,许多 NK 细胞失去了杀伤能力,有些甚至促进了肿瘤的生长。研究发现,肿瘤组织微环境 NK 细胞表现出异质性和功能障碍,抑制肿瘤生长的能力遭到破坏,失去了抗肿瘤功能^[17-18]。大部分晚期肿瘤都能逃避 NK 细胞的杀伤,本研究观察到第 12 周时,肿瘤中 NK 细胞比例逐渐增加,杀伤肿瘤细胞的功能受到抑制。根据 NK 细胞在实体瘤中失能的特征,为进一步恢复肿瘤内 NK 细胞和增强抗肿瘤免疫提供新思路。MDSCs 是未成熟骨髓细胞的异质群,通过抑制 T 细胞、NK 细胞等免疫细胞的活性,削弱机体的抗肿瘤免疫反应,从而为肿瘤细胞的生长和转移创造有利条件^[19-21]。本实验中小鼠 12 周时脾、血液、肿瘤中 MDSCs 细胞比例则呈逐渐上升态势。MMTV-PyMT 小鼠随着周龄的增加,MDSCs 在细胞中增加,促进了肿瘤转移微环境形成。减少 MDSCs 在转移前微环境的聚集,可以降低肿瘤细胞的侵袭和转移能力。

综上所述,本研究通过从乳腺癌实验动物不同周龄的选择出发,有助于更全面地理解乳腺癌从早期到晚期的发展。首次利用流式细胞术分析了肿瘤免疫微环境中细胞组成的变化,不仅提高了分析的精确度和深度,还揭示了免疫细胞亚群随时间的动态变化规律,为实验者提供了更准确地时间节点,从而在最佳时机进行组织取样。这不仅有助于节省实验时间和物质成本,还能够有效筛选高效抗肿瘤药物,进一步推动乳腺癌研究的深入发展。

参 考 文 献(References)

- [1] SIEGEL R L, GIAQUINTO A N, JEMAL A. Cancer statistics, 2024 [J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(1): 12-49.
- [2] 李江平,李志平. 肿瘤微环境在癌症中的动态演变过程 [J]. 现代肿瘤医学, 2024, 32(7): 1344-1349.
LI J P, LI Z P. Dynamic evolution of tumor microenvironment in cancer [J]. Mod Oncol, 2024, 32(7): 1344-1349.
- [3] ATTALLA S, TAIFOUR T, BUI T, et al. Insights from

- transgenic mouse models of PyMT-induced breast cancer; recapitulating human breast cancer progression *in vivo* [J]. *Oncogene*, 2021, 40(3): 475-491.
- [4] CAI Y, NOGALES-CADENAS R, ZHANG Q, et al. Transcriptomic dynamics of breast cancer progression in the MMTV-PyMT mouse model [J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 185.
- [5] RENNHACK J P, TO B, SWIATNICKI M, et al. Integrated analyses of murine breast cancer models reveal critical parallels with human disease [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3261.
- [6] 郎佳丽, 金璐, 邵霞, 等. 不同性别 PyMT 自发性乳腺癌小鼠成瘤特点和不同时间肺转移观察 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2019, 43(11): 1207-1212, 1226.
- LANG J L, JIN L, SHAO X, et al. Tumorigenic characteristics of PyMT mice with spontaneous breast cancer in different genders and observation of pulmonary metastasis in different time [J]. *J Zhejiang Chin Med Univ*, 2019, 43(11): 1207-1212, 1226.
- [7] KHALED N, BIDEY Y. New insights into the implication of epigenetic alterations in the EMT of triple negative breast cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(4): 559.
- [8] DUPRÉ A, MALIK H Z. Inflammation and cancer: what a surgical oncologist should know [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2018, 44(5): 566-570.
- [9] WU L, SAXENA S, AWAJI M, et al. Tumor-associated neutrophils in cancer: going pro [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(4): 564.
- [10] BATALHA S, FERREIRA S, BRITO C. The peripheral immune landscape of breast cancer: clinical findings and *in vitro* models for biomarker discovery [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(6): 1305.
- [11] LUO D, ZHONG Q, YUE H, et al. The predictors of lymphopenia and its effects on survival in locally advanced esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Biol Ther*, 2024, 25(1): 2371632.
- [12] MADEDDU C, GRAMIGNANO G, ASTARA G, et al. Pathogenesis and treatment options of cancer related anemia: perspective for a targeted mechanism-based approach [J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 1294.
- [13] GARCIA-LEON M J, LIBONI C, MITTELHEISSER V, et al. Platelets favor the outgrowth of established metastases [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 3297.
- [14] XUE J, DENG J, QIN H, et al. The interaction of platelet-related factors with tumor cells promotes tumor metastasis [J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 371.
- [15] ZHAO Y, SHAO Q, PENG G. Exhaustion and senescence: two crucial dysfunctional states of T cells in the tumor microenvironment [J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17(1): 27-35.
- [16] ZENG Z, CHEW H Y, CRUZ J G, et al. Investigating T cell immunity in cancer: achievements and prospects [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6): 2907.
- [17] DEAN I, LEE C Y C, TUONG Z K, et al. Rapid functional impairment of natural killer cells following tumor entry limits anti-tumor immunity [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 683.
- [18] ZHENG X, HOU Z, QIAN Y, et al. Tumors evade immune cytotoxicity by altering the surface topology of NK cells [J]. *Nat Immunol*, 2023, 24(5): 802-813.
- [19] ALSHETAIWI H, PERVOLARAKIS N, MCINTYRE L L, et al. Defining the emergence of myeloid-derived suppressor cells in breast cancer using single-cell transcriptomics [J]. *Sci Immunol*, 2020, 5(44): eaay6017.
- [20] UMANSKY V, BLATTNER C, GEBHARDT C, et al. The role of myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in cancer progression [J]. *Vaccines (Basel)*, 2016, 4(4): 36.
- [21] PRAMANIK A, BHATTACHARYYA S. Myeloid derived suppressor cells and innate immune system interaction in tumor microenvironment [J]. *Life Sci*, 2022, 305: 120755.

[收稿日期] 2024-08-08