白介素-17在三阴性乳腺癌中的表达及其与新生血管和预后的相关性

周　琼[1]，董　杰[1]，沈夏波[1]，李世兰[2]，鹿楠楠[2]，潘跃银[2]，韩兴华[1,2]
（1. 安徽医科大学附属省立医院，安徽 合肥 230001；
2. 中国科学技术大学附属第一医院，安徽 合肥 230001）

摘　要：［目的］探讨白介素-17（interleukin-17，IL-17）在三阴性乳腺癌肿瘤间质中的表达与微血管密度（microvessel density，MVD）及预后的关系。［方法］免疫组化法标记54例三阴性乳腺癌肿瘤间质中IL-17和CD34的表达，分析IL-17与微血管密度及临床病理参数之间的相关性。［结果］IL-17在54例三阴性乳腺癌肿瘤间质中的阳性细胞百分比为39.02%。IL-17高表达组的患者微血管密度更高（335.66个/mm^2 *vs* 244.76个/mm^2，P=0.017）。Spearman相关分析显示IL-17阳性细胞百分比与微血管密度呈正相关（r=0.454，P<0.001）。无复发生存期（relapse-free survival，RFS）生存分析显示，IL-17高表达的三阴性乳腺癌患者RFS较差。［结论］IL-17在一定程度上可能通过促进肿瘤内炎症的发生及血管新生促进肿瘤的浸润生长，同时，IL-17也是影响三阴性乳腺癌术后复发的潜在因素。
主题词：白介素-17；微血管密度；三阴性乳腺癌
中图分类号：R737.9　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1671-170X（2021）01-0053-05
doi：10.11735/j.issn.1671-170X.2021.01.B011

Expression of Interleukin-17 in Triple Negative Breast Cancer and Its Relation with Neovascularization and Prognosis

ZHOU Qiong[1]，DONG Jie[1]，SHEN Xia-bo[1]，LI Shi-lan[2]，LU Nan-nan[2]，PAN Yue-yin[2]，HAN Xing-hua[1,2]
（1. *Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University，Hefei* 230001，*China*；2. *First Affiliated Hospital of USTC，University of Science and Technology of China，Hefei* 230001，*China*）

Abstract：［Objective］To investigate the expression of interleukin-17（IL-17）in triple negative breast cancer（TNBC）and its relationship with vasculization and prognosis of patients.［Methods］Immunohistochemistry was used to detect the expression of IL-17 and CD34 in the tumor stroma of 54 cases of TNBC，and the correlation of IL-17 expression with microvessel density（MVD）and clinicopathological parameters was analyzed.［Results］The percentage of IL-17 positive cells in the tumor stroma of 54 cases of TNBC was 39.02%. The patients with high expression of IL-17 had higher MVD（335.66/mm^2 *vs* 244.76/mm^2，P=0.017）. Spearman's correlation analysis showed that the percentage of IL-17 positive cells was positively correlated with MVD（r=0.454，P<0.001）. The median recurrence-free survival（RFS）time in TNBC patients with high expression of IL-17 was significantly lower than that of those with low expression of IL-17［Conclusion］IL-17 may promote tumor infiltration and growth by promoting intratumor inflammation and angiogenesis. Simultaneously，IL-17 is also a potential factor affecting the postoperative recurrence of TNBC.
Subject words：interleukin-17；microvessel density；triple negative breast cancer

三阴性乳腺癌是雌激素受体、孕激素受体和人表皮生长因子受体2均不表达的乳腺癌亚型，其发病率大约占全部乳腺癌类型的12%~17%[1]。肿瘤微环境（tumor mircroenvironment，TME）是肿瘤细胞发挥生物学功能的复杂系统[2]。免疫细胞及其分泌的细胞因子等是TME的基本组成部分。虽然免疫系统对于抗肿瘤反应很重要，但也能促进几乎所有实体肿瘤的发生和发展，细胞因子和细胞介质可以修饰TME，有利于肿瘤的发生和发展[3]。白介素-17是一个细胞因子家族，包括结构相关的6个家族成员，即IL-17A、IL-17B、IL-17C、IL-17D、IL-17E和IL-17F[4]。IL-17主要是由CD4$^+$的Th17细胞分泌，参与炎症及

基金项目：安徽省2018年度重点研究与开发计划项目（1804h08020259）
通信作者：韩兴华，副主任医师，博士；安徽医科大学附属省立医院；中国科学技术大学附属第一医院肿瘤化疗科，安徽省合肥市蜀山区荷叶地街道天鹅湖路1号（230001）；E-mail：hanxhua123@163.com
收稿日期：2020-06-29；**修回日期**：2020-08-31

自身免疫性疾病的发生。IL-17 在肿瘤微环境中介导的炎症反应参与了肿瘤发展的多个过程。研究发现，IL-17 可以通过直接或间接的方式促进多种肿瘤的血管新生，从而导致肿瘤的快速生长、侵袭和远处转移[5-6]。此外，IL-17 还可通过 G-CSF-Bv8 依赖的方式促进淋巴瘤、肺癌、结肠癌抗血管生成治疗的耐药的发生[7]。乳腺癌中 IL-17 水平升高，但对其在三阴性乳腺癌组织与肿瘤微环境内血管密度之间的联系及其临床意义研究不多。组织中 IL-17 阳性细胞和微血管密度（microvessel density，MVD）的潜在联系仍需要进一步量化和研究。

1 资料与方法

1.1 患者一般资料

纳入标准：①术后病理明确为原发性乳腺癌；②有完整的免疫组织化学的检查结果报告；③分子分型：ER(−)，PR(−)，Her-2(−)；或 ER(−)，PR(−)，Her-2(++)，行 FISH 检测结果为阴性；④初治为手术治疗，术前均未接受放疗、化疗、免疫治疗等相关抗肿瘤治疗；⑤无风湿免疫等相关疾病病史：如银屑病、关节炎、干燥综合征、炎症性肠病等。

排除标准：①分子分型为非三阴性型乳腺癌；②已发生远处转移；③合并有银屑病、关节炎、干燥综合征或炎症性肠病等病史；④接受新辅助化疗、局部放疗等相关抗肿瘤治疗。

本研究属于回顾性分析，共纳入安徽医科大学附属省立医院 2015 年 7 月至 2018 年 12 月因乳腺肿瘤行手术切除的女性原发性三阴性乳腺癌患者 54 例。患者平均年龄（53.7±11.2）岁。组织类型：浸润性导管癌。分化程度：Ⅰ级 3 例，Ⅱ级 8 例，Ⅲ级 43 例，淋巴结转移 24 例，无淋巴结转移 30 例。参照美国癌症联合委员会（American joint committee on cancer，AJCC）第 8 版肿瘤分期系统，对纳入本研究的所有患者进行病理分期（pTNM），Ⅰ期 13 例，ⅡA 期 22 例，ⅡB 期 11 例，Ⅲ期 8 例。

1.2 IL-17 及 CD34 免疫组织化学染色

采用免疫组织化学 SP 法，IL-17 工作液浓度为 1:200，CD34 抗体为即用型抗体。PBS 代替一抗为阴性对照，阳性对照为已知阳性的乳腺癌组织。具体步骤参照试剂盒说明书进行。IL-17（兔）多克隆抗体原液来源于美国 Abcam 公司，鼠抗人 CD34 即用型单克隆抗体来源于北京中杉金桥生物公司，免疫组化试剂盒及 DAB 显色液、碘磷酸盐缓冲液（PBS）、苏木素染色液、中性树胶均购自长春麦新生物公司。所有标本均来自安徽医科大学附属省立医院病理科石蜡包埋组织，切片厚 2μm。

1.3 免疫组化结果判定

IL-17：IL-17 阳性染色为棕（黄）色，阳性定位于细胞胞质中。免疫组化切片均使用数字切片扫描仪（3DHISTECH Ltd. Hungary）转换为数字切片，并使用软件（CaseViewer2.2，3DHistech Ltd.Hungary）进行图像处理分析。每张切片图像分析软件随机观察 3 个低倍镜（×100）视野，然后调整至高倍镜（×200）视野，采集照片后用 Image J（imagej.nih.gov，version 1.53a）软件测量每张照片 3 个计数区域的阳性细胞数和细胞总数，计算 IL-17 阳性细胞的百分比。阳性细胞的平均百分比=（阳性细胞数/细胞总数）×100%。

CD34：CD34 阳性染色为棕（黄）色，阳性定位于血管内皮细胞胞质中。MVD 计数方法参考 Chalkey 法。具体原则为：被 CD34 抗体染成棕黄色的单个的内皮细胞，内皮细胞簇团与邻近微血管和肿瘤细胞分开就计数为一个血管。如果管腔直径超过 8 个红细胞大小或血管壁包含肌层不能计入总数。计数 MVD，单位为个/mm^2。染色采用双盲法观察免疫组化的阳性反应，首先在低倍镜下选择 CD34 棕褐色染色较为集中的部位，然后在高倍显微镜视野下进行微血管计数。对每张切片选取 3 个视野进行计数，把组织微血管内皮细胞染色计数后取平均值。

1.4 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件进行数据分析，分类变量以频数和百分率表示，采用 χ^2 检验。连续变量非正态分布采用中位数表示，进行非参数 Man-Whitney U 检验，相关性分析采用 Spearman 分析。采用 Kaplan-Meier 法对无复发生存期（relapse-free survival，RFS）进行分析，统计学检验均采用双侧法，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 IL-17 和 CD34 在乳腺肿瘤间质中的表达

在三阴性乳腺癌组织的肿瘤间质，IL-17 染色主

要定位于细胞的胞浆(Figure 1a)。CD34 染色定位于血管内皮细胞的胞浆(Figure 1a)。阳性染色均表现为棕黄色。IL-17 阳性细胞百分比为 39.02%(19.23%~77.75%),以中位数为界值,将 IL-17 表达水平分为高(n=27 例)、低(n=27 例)表达两组,IL-17 高表达的患者微血管密度高 (335.66/mm^2 *vs* 244.76 个/mm^2, *P*=0.017)(Figure 1b)。相关分析显示 IL-17 阳性细胞百分比与微血管密度呈显著性正相关 (r=0.454, P<0.001)(Figure 1c)。

2.2 IL-17 阳性细胞与三阴性乳腺癌临床病理特征的关系

乳腺癌中 IL-17 表达与病理分期有关(*P*=0.001),肿瘤分期越高,IL-17 阳性表达细胞越多。伴有淋巴结转移的患者与淋巴结阴性患者 IL-17 表达差异有统计学意义(*P*=0.006)(Table 1)。

2.3 IL-17 阳性细胞数与外周血细胞参数的关系

以中位数(1.78×10^9/L)为截断值进行分组,外周血淋巴细胞计数(*P*=0.029)与组织中 IL-17 阳性细胞数之间有统计学意义关联(Table 1)。

2.4 IL-17 表达与临床预后的关系

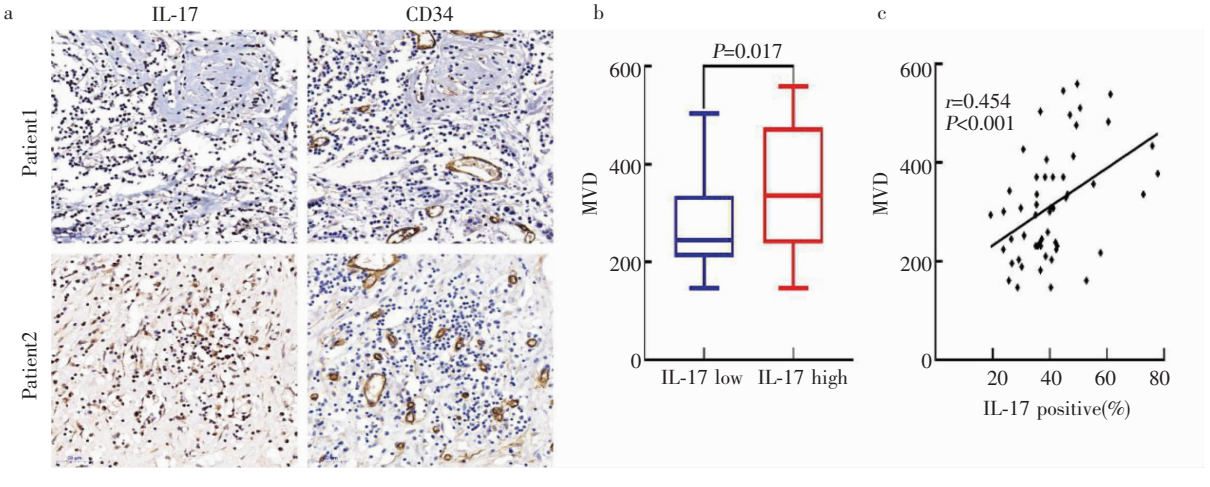
IL-17A 表达与乳腺癌患者较好的RFS 有关,HR=0.73,95%CI:0.66~0.82,*P*<0.05。三阴性乳腺癌患者中 IL-17 高表达患者的 RFS 更短, 低表达和高表达者中位生存时间分别为 30.42 个月和 27.00 个月(Figure 2)。

3 讨 论

三阴性乳腺癌作为乳腺癌的一种特殊的分子亚型,具有侵袭性强、复发率高、生存率低的特点,治疗手段仍以化疗为主。IL-17 是一类由免疫细胞和肿瘤微环境中肿瘤转化细胞分泌的细胞因子。多项研究表明,IL-17 诱导的炎症可以参与多种肿瘤微环境内肿瘤血管的新生。

人们对于 IL-17 的认识主要是基于自身免疫疾病中的促炎作用。通过直接或间接阻断 IL-17 的方式,在治疗自身免疫性疾病方面取得了良好的效果。IL-17 单克隆抗体已经被 FDA 批准用于银屑病和强直性脊柱炎的临床治疗[4]。近年来,随着研究的不断深入,人们发现 IL-17 在多种人类肿瘤中表达升高,包括宫颈癌、肝细胞癌、卵巢癌、食管癌、乳腺癌、胃癌和结直肠癌[8]。

为了进一步探究 IL-17 与三阴性乳腺癌的生物学行为之间的关系, 我们通过免疫组织化学方法对 54 例三阴性乳腺癌患者术后石蜡包埋组织分别进行 IL-17 阳性细胞和血管内皮标记,结果显示 IL-17 阳性细胞与 MVD 存在统计学相关性 (*P*=0.017),提示 IL-17 可能参与肿瘤微环境内血管的生成, 但具体机制仍需要进一步实验验证。1996 年 Folkman 团队首先提出肿瘤血管学说[9],经 20 余年的发展,肿瘤间质微血管的发生对肿瘤生长、转移的重要作用



a: Expression of IL-17 positive cells and CD34 microvessel density staining in tumor stroma of triple negative breast cancer (×200)
b: Quantitative analysis of immunohistochemical staining: three random high power visual fields were selected for each section to count the number of positive vessels stained by CD34. Hypothesis test: nonparametric Man-Whitney *U* test, *P*=0.017.
c: Expression of IL-17 positive cells was positively correlated with MVD.

Figure 1 Expression of IL-17 positive cells and CD34 in patients with triple negative breast cancer

Table 1 Correlation between IL-17 expression and clinicopathologic characteristics of TNBC patients

Characteristics	N	Low IL-17	High IL-17	χ^2	*P*
Age (years-old)				1.33	0.248
≥60	18	7	11		
<60	36	20	16		
BMI(kg/m^2)				0.30	0.586
≥24	28	13	15		
<24	26	14	12		
Ki-67 (%)				0.43	0.513
≥30	42	22	20		
<30	12	5	7		
Tumor size (cm)				4.33	0.093
≤2	23	15	8		
>2~5	30	12	18		
>5	1	0	1		
Lymph nodes status				7.50	0.006
Negative	30	20	10		
Positive	24	7	17		
TNM stage				11.27	0.001
Ⅰ	13	10	3		
ⅡA	22	13	9		
ⅡB	11	3	8		
Ⅲ	8	1	7		
Neutrophil(10^9/L)				0.67	0.414
≥3.03	27	15	12		
<3.03	27	12	15		
Lymphocyte(10^9/L)				4.75	0.029
≥1.78	28	18	10		
<1.78	26	9	17		
PLT(10^9/L)				3.63	0.057
≥190	27	17	10		
<190	27	10	17		
Neutrophil to lymphocyte ratio				1.85	0.174
≥1.79	27	11	16		
<1.79	27	16	11		
Platelet to lymphocyte ratio				0.07	0.785
≥110.13	27	13	14		
<110.13	27	14	13		

已经被广泛认可。微血管密度作为一种计数肿瘤血管的定量指标,除了可以反映肿瘤生长状况,还能对肿瘤的复发转移起着预测作用[10]。Chang 等[11]发现 IL-17 基因敲除的肺癌小鼠模型中,IL-17 缺失不仅导致肿瘤细胞增殖和血管生成减少，而且还降低了促炎介质的表达,减少了髓系细胞的募集。

本研究还比较了 IL-17 与肿瘤炎症之间的关系，发现外周血淋巴细胞计数与 IL-17 的表达存在统计学意义关联,IL-17 高表达组中，外周血淋巴细

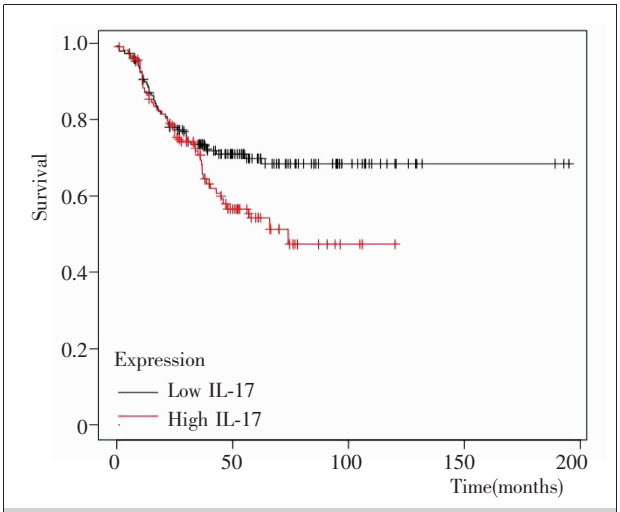


Figure 2 Survival curve of IL-17 high expression in triple negative breast cancer patients

胞相对偏高。大量研究表明,中性粒细胞、淋巴细胞、血小板参与了促瘤炎症的发生，提示肿瘤不良的预后,具体机制尚未完全清楚[12]。IL-17 刺激动员髓系的细胞因子(如 G-CSF)的产生,以扩增髓系细胞,如参与构成肿瘤微环境的中性粒细胞或 MDSCs。大量的中性粒细胞及 MDSCs 通过抑制肿瘤浸润 CD8$^+$ T 细胞抑制抗肿瘤免疫,从而促进肿瘤进展。较高的血小板计数与乳腺癌的转移有关。一方面活化的血小板可以产生溶血磷脂酸,加速了肿瘤的远处转移[13]。与此同时，血小板还以分泌血管内皮生长因子和促进炎症细胞迁移的方式促进肿瘤微环境内血管的生成[14-15]。淋巴细胞在细胞介导的抗肿瘤免疫反应和肿瘤免疫监测中发挥重要作用。Loi 等[16]发现乳腺癌中淋巴细胞浸润增加提示良好的预后，特别是在淋巴结阳性和 Her-2 阴性的乳腺癌中更明显。近年来，中性粒细胞与淋巴细胞比例和血小板与淋巴细胞比例被认为是评估肿瘤炎症水平的重要因素，是多种肿瘤预后的评价指标[12]。但本研究并未发现中性粒细胞与淋巴细胞比例和血小板与淋巴细胞比例与 IL-17 的表达水平之间的相关性,提示 IL-17 阳性细胞的表达在乳腺肿瘤炎症中的作用仍需要进一步的探索。

IL-17 在肿瘤中的临床意义仍然存在很大争议。不同的研究表明,IL-17 在肿瘤发生发展中不仅与肿瘤类型有关，在一定程度上还取决于肿瘤微环境中的其他因素。多项研究表明,肝癌、结肠癌、非小细胞肺癌肿瘤组织及外周血中 IL-17 的表达均与较差肿

瘤病理分期及淋巴结状态有关，提示较差的预后。但也有研究显报道发现相反的结果。Punt 等[17]和 Jain 等[18]研究均表明，Th17 阳性细胞是肿瘤预后的良好指标，Th17 阳性细胞的升高与较长的总生存期相关。研究表明，这种临床意义的差异可能是因为 IL-17 主要促进肿瘤的发生，而产生 IL-17 的 Th17 细胞亚群具有抑瘤作用。本文分析显示 IL-17 高表达是三阴性乳腺癌的危险因素（HR=1.54）。IL-17 的高表达与三阴性乳腺癌不良预后有关（P<0.05）。IL-17 对于乳腺癌预后影响的差异可能与三阴性乳腺癌特殊的免疫微环境相关。研究发现，与其他类型的乳腺癌相比，TME 由更多的肿瘤浸润性淋巴细胞和肿瘤相关巨噬细胞组成，并且表达更高水平的血管内皮生长因子和促进肿瘤细胞生长和迁移的分子[19]。免疫细胞与乳腺癌预后的关系可以受到多种因素的影响，同时，不同的免疫细胞亚型对肿瘤的发展也表现出不同的影响[20]。

然而，本研究仍然有很多不足之处：①本研究非多中心研究，样本量较少，各分组的样本量较少。我们将进一步扩大样本量研究；②本研究属于回顾性研究，通过电话随访，复发转移及死亡事件发生的例数较少，另外还有少数病例因为不同原因失访。

综上，IL-17 可能通过参与三阴性乳腺癌肿瘤间质中炎症反应和微血管形成，从而促进肿瘤的生长、侵袭及远处转移等恶性生物学行为的发生，导致乳腺癌不良的预后。

参考文献：

[1] Bray F，Ferlay J，Soerjomataram I，et al. Global cancer statistics 2018：globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin，2018，68(6)：394–424.

[2] Hanahan D，Weinberg RA. Hallmarks of cancer：the next generation[J]. Cell，2011，144(5)：646–674.

[3] Gorczynski RM. IL-17 signaling in the tumor microenvironment[J]. Adv Exp Med Biol，2020，1240(1)：47–58.

[4] McGeachy MJ，Cua DJ，Gaffen SL. The IL-17 family of cytokines in health and disease[J]. Immunity，2019，50(4)：892–906.

[5] Du JW，Xu KY，Fang LY，et al. Interleukin-17，produced by lymphocytes，promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of breast cancer [J]. Mol Med Rep，2012，6(5)：1099–1102.

[6] Pan B，Shen J，Cao J，et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis by stimulating vegf production of cancer cells via the stat3/giv signaling pathway in non-small-cell lung cancer[J]. Sci Rep，2015，5(1)：16053.

[7] Chung AS，Wu X，Zhuang G，et al. An interleukin-17-mediated paracrine network promotes tumor resistance to anti-angiogenic therapy[J]. Nat Med，2013，19(9)：1114–1123.

[8] Punt S，Langenhoff JM，Putter H，et al. The correlations between IL-17 vs. Th17 cells and cancer patient survival：a systematic review[J]. Oncoimmunology，2015，4(2)：e984547.

[9] Klement GL，Yip TT，Cassiola F，et al. Platelets actively sequester angiogenesis regulators[J]. Blood，2009，113(12)：2835–2842.

[10] Poon RT，Ng IO，Lau C，et al. Tumor microvessel density as a predictor of recurrence after resection of hepatocellular carcinoma：a prospective study[J]. J Clin Oncol，2002，20(7)：1775–1785.

[11] Chang SH，Mirabolfathinejad SG，Katta H，et al. T helper 17 cells play a critical pathogenic role in lung cancer[J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2014，111(15)：5664–5669.

[12] Guo W，Lu X，Liu Q，et al. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio for breast cancer patients：an updated meta-analysis of 17079 individuals[J]. Cancer Med，2019，8(9)：4135–4148.

[13] Leblanc R，Lee SC，David M，et al. Interaction of platelet-derived autotaxin with tumor integrin alphavbeta3 controls metastasis of breast cancer cells to bone[J]. Blood，2014，124(20)：3141–3150.

[14] Ghasemzadeh M，Hosseini E. Intravascular leukocyte migration through platelet thrombi：directing leukocytes to sites of vascular injury[J]. Thromb Haemost，2015，113(6)：1224–1235.

[15] Jenne CN，Kubes P. Platelets in inflammation and infection[J]. Platelets，2015，26(4)：286–292.

[16] Loi S，Sirtaine N，Piette F，et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase Ⅲ randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy：Big 02–98 [J]. J Clin Oncol，2013，31(7)：860–867.

[17] Punt S，Fleuren GJ，Kritikou E，et al. Angels and demons：Th17 cells represent a beneficial response，while neutrophil IL-17 is associated with poor prognosis in squamous cervical cancer[J]. Oncoimmunology，2015，4(1)：e984539.

[18] Jain P，Javdan M，Feger FK，et al. Th17 and non-Th17 interleukin-17-expressing cells in chronic lymphocytic leukemia：delineation，distribution，and clinical relevance [J]. Haematologica，2012，97(4)：599–607.

[19] Oner G，Altintas S，Canturk Z，et al. Triple-negative breast cancer-role of immunology：a systemic review[J]. Breast J，2020，26(5)：995–999.

[20] Kim HM，Koo JS. Clinicopathologic characteristics of breast cancer according to the infiltrating immune cell subtypes[J]. Int J Mol Sci，2020，21(12)：4438.