

# 小鼠乳腺癌动物模型中调节性 T 细胞的 动态检测及其实验意义\*

朱红梅<sup>1,2,3</sup>, 胡 婷<sup>2,3,4</sup>, 杨 媚<sup>2,3,4</sup>, 王 和<sup>2,3,4</sup>, 陈新莲<sup>2,3,4</sup>, 谢晓砚<sup>1,2,3</sup>, 刘珊玲<sup>1,2,3△</sup>

1. 四川大学华西第二医院 西部妇幼医学研究院 细胞与基因治疗实验室(成都 610041); 2. 四川大学华西第二医院  
妇产科教研室(成都 610041); 3. 四川大学华西第二医院 妇儿疾病与出生缺陷教育部重点实验室(成都 610041);  
4. 四川大学华西第二医院 西部妇幼医学研究院 遗传实验室(成都 610041)

**【摘要】 目的** 分析小鼠乳腺癌实验动物模型中调节性 T 细胞(Tregs)的变化,并探讨其在肿瘤发生中的意义。**方法** 建立小鼠乳腺癌动物模型。在肿瘤接种后 1 周、3 周和 6 周 3 个不同时间点,流式细胞术(FACS)检测 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 和 CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞在脾脏、引流淋巴结和肿瘤组织中所占的 CD4<sup>+</sup>T 细胞细胞的比例,CD4<sup>+</sup>T 细胞中 CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> 双阳的表达情况,肿瘤组织中 CD4<sup>+</sup>T 细胞占肿瘤浸润 T 淋巴细胞(CD3<sup>+</sup>T)的比例。**结果** 与正常对照组比较,在小鼠乳腺癌动物模型中,脾脏和淋巴结中 CD4<sup>+</sup>T 细胞占淋巴细胞的比例在荷瘤 1 周、3 周和 6 周逐渐下降( $P<0.05$ );脾脏和淋巴结中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 和 CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> 在 CD4<sup>+</sup>T 细胞中的比例,随荷瘤时间延长而增高( $P<0.05$ );脾脏和淋巴结中 CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> 在 CD4<sup>+</sup>T 细胞中的表达随荷瘤时间延长也增多( $P<0.05$ )。在肿瘤浸润 T 淋巴细胞(CD3<sup>+</sup>T)中,CD4<sup>+</sup>T 细胞和 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞的表达在荷瘤 3 周均较荷瘤 1 周时增多( $P<0.05$ );肿瘤组织中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 和 CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> 在 CD4<sup>+</sup>T 细胞中的比例,在荷瘤 1 周和荷瘤 3 周差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** 调节性 T 细胞在恶性肿瘤模型中表达增加,在肿瘤的发生发展中发挥重要作用。

**【关键词】** 调节性 T 细胞 小鼠乳腺癌实验动物模型 淋巴细胞

**Dynamic Detection of Regulatory T Cells in Murine Mammary Carcinoma Model and Its Significance** ZHU Hong-mei<sup>1,2,3</sup>, HU Ting<sup>2,3,4</sup>, YANG Mei<sup>2,3,4</sup>, WANG He<sup>2,3,4</sup>, CHEN Xin-lian<sup>2,3,4</sup>, XIE Xiao-yan<sup>1,2,3</sup>, LIU Shan-ling<sup>1,2,3△</sup>. 1. Laboratory of Cell and Gene Therapy, West China Institute of Women and Children's Health, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Key Laboratory of Obstetrics&Gynecology and Pediatric Diseases and Birth Defects of Ministry of Education, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 4. Laboratory of Genetics, West China Institute of Women and Children's Health, West China Second Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China  
△ Corresponding author, E-mail: sunny630@126.com

**【Abstract】 Objective** To analyze the dynamic change of regulatory T cells in experimental murine mammary carcinoma model, and to investigate their effect on tumor progress. **Methods** Mouse mammary carcinoma models were established. The percentages of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the CD4<sup>+</sup>T cells in tumor tissue, tumor draining lymph node and spleen were measured by FACS at 3 different time points after tumor challenge. The expression of CD25<sup>+</sup>FOXP3 in CD4<sup>+</sup>T cells was analyzed, and the expression of CD4<sup>+</sup>T cells in T cells (CD3<sup>+</sup>) of tumor tissue. **Results** Compared with the normal control group, In mouse mammary carcinoma models, The percentages of CD4<sup>+</sup>T cells to lymphocytes in lymph node and spleen were decreased in the late stage ( $P<0.05$ ). The percentages of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the CD4<sup>+</sup>T cells were markedly increased ( $P<0.05$ ). The percentages of CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the CD4<sup>+</sup>T cells were markedly increased also ( $P<0.05$ ). In the tumor tissue, the percentages of CD4<sup>+</sup>T cells and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in T cells (CD3<sup>+</sup>) were increased in three weeks after the tumor challenge than one week ( $P<0.05$ ). The percentages of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the CD4<sup>+</sup>T cells have no change between one week and three weeks after tumor planting ( $P>0.05$ ). **Conclusion** Regulatory T cells were significantly increased in malignant tumor model, and closely related to the development of tumor.

**【Key words】** Regulatory T cells Experimental animal model of murine mammary carcinoma Lymphocytes

\* 国家自然科学基金(No. 30772323)和四川省科技厅支撑项目(No. 2008SZ0018)资助

△ 通讯作者, E-mail: sunny630@126.com

乳腺癌作为危害女性生命的恶性肿瘤之一,其发病率近年来居于女性肿瘤发病率的首位,病死率在肿瘤中仅次于肺癌<sup>[1,2]</sup>。近年来由于肿瘤筛查和传统治疗方法的改进,乳腺癌的死亡率有下降趋势,

但是传统的治疗方法仍不能得到令人满意的治疗效果<sup>[1,3]</sup>。免疫治疗作为近年来新型的治疗手段,有望成为肿瘤治疗和改善预后的有效途径。

近三十年的研究已经表明肿瘤的免疫逃逸是其发生的重要机制。大量证据证明 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>调节性 T 细胞(regulatory T cells, Tregs)在这一过程中发挥重要的作用<sup>[4]</sup>。因此,针对抑制或消除 Tregs 的肿瘤免疫治疗已成为免疫治疗中的一个重要方面。已有研究证明在卵巢癌、非小细胞肺癌、乳腺癌等恶性肿瘤中,肿瘤引流淋巴结中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>调节性 T 细胞数量增多,且与肿瘤的预后呈负相关<sup>[5-8]</sup>。但是肿瘤实验动物模型中,尚缺乏肿瘤组织和脾脏中 Tregs 变化趋势的实验数据。

本实验用小鼠来源乳腺癌细胞株 4T1 建立的小鼠乳腺癌动物模型,检测荷瘤小鼠脾脏、肿瘤引流淋巴结和肿瘤组织中 Tregs 的动态变化及与肿瘤进展间关系,为后续针对抑制 Tregs 的免疫治疗研究选择合适的动物模型及监测靶组织,以明确诱导 Tregs 的凋亡、无能或诱导迁移在肿瘤免疫治疗中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

BALB/c 小鼠 20 只(约 6 周龄,18~20 g,雌性)购自四川大学实验动物中心,饲养于 SPF 环境中。

### 1.2 细胞系

4T1 细胞为 BALB/c 小鼠来源乳腺癌细胞系,由美国 Duke 大学放射肿瘤系 Prof. Li 实验室馈赠。细胞培养用含 10%胎牛血清(FBS)、1000 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 DMEM/HIGH GLUCOSE 培养基(HyClone),于含 5% CO<sub>2</sub> 的 37℃恒温培养箱中培养。

### 1.3 实验主要试剂和仪器

小鼠 Tregs 检测试剂盒,包括 FITC anti mouse CD4、PE anti mouse CD25、PE-Cy5 anti mouse FOXP3、PE-Cy5 Rat IgG2α iso 和 Fc block,购自 eBioscience 公司;PE-Cy7 anti mouse CD3、PE Rat IgG1 iso 和 FITC Rat IgG2 iso 均购自 eBioscience 公司;流式细胞术(FACS)检测设备为 BD 公司流式细胞仪(BD FACS Aria II)。

### 1.4 小鼠肿瘤模型的建立和分组

BALB/c 小鼠约 6 周龄(约 20 g)时建立肿瘤模

型。收集对数生长期 4T1 细胞制成单细胞悬液,在 15 只小鼠右侧后腿皮下接种 4T1 细胞 1×10<sup>5</sup>/只,共接种一次。正常对照组(5 只)每只小鼠右侧后腿皮下注射 PBS 100 μL,共接种一次。

### 1.5 成瘤标准和标本收集

用游标卡尺测量肿瘤的长径和短径,肿瘤体积=π/6×长×宽<sup>2</sup>(约 1/2×长×宽<sup>2</sup>)。当肿瘤长径×短径达 2 mm×2 mm 时判断肿瘤成瘤阳性。肿瘤成瘤后按肿瘤体积的大小顺序编号,将其随机分为 3 组,每组 5 只,分别在其荷瘤 1 周、3 周和 6 周时常规处死小鼠,并收集荷瘤小鼠脾脏、肿瘤引流淋巴结和肿瘤组织进行 FACS 检测,组间肿瘤体积比较差异无统计学意义。在 BALB/c 小鼠约 9 周龄时,常规处死正常对照组 5 只小鼠,收集正常小鼠脾脏和淋巴结。

### 1.6 FACS 检测样本制备

乳腺癌动物模型 BALB/c 小鼠在荷瘤第 1 周、第 3 周和第 6 周 3 个时间点,常规处死 5 只小鼠,收集荷瘤小鼠脾脏、肿瘤引流淋巴结和肿瘤组织。

脾脏和淋巴结单细胞悬液制备:用 5 mL 或 2.5 mL 注射器活塞芯杆的平端在小培养皿中轻轻研磨组织,然后将悬液滤过 70 μm 细胞筛,1500 r/min 离心后弃上清,用红细胞裂解液将脾脏中红细胞破除,离心后弃上清,用含 5%FBS 的 PBS 缓冲液悬浮细胞。

肿瘤组织单细胞悬液制备:用手术刀将肿瘤组织切碎,过 40 μm 细胞筛后用 5 mL 或 2.5 mL 注射器活塞芯杆的橡皮套端研磨未滤过组织至糊状,并用含 5%FBS 的 PBS 缓冲液充分冲洗细胞筛收集滤液,1500 r/min 离心后弃上清,用含 5%FBS 的 PBS 缓冲液重悬细胞。

脾脏和淋巴结细胞计数方法:用血细胞计数板计数活细胞,用 0.4%台盼兰与细胞悬液 1:1(体积比)、混匀后倒置显微镜下计数,计算细胞悬液细胞密度(/mL)。

### 1.7 FACS 检测 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>调节性 T 细胞

将上述单细胞悬液用含 5%FBS 的 PBS 缓冲液洗 1 次后,重悬并调整细胞密度至 1×10<sup>7</sup>/mL。将细胞悬液加入相对应的流式管,每管中加入 100 μL 细胞悬液。脾脏和淋巴结的样本管中加入 FITC 标记的 CD4 抗体、PE 标记的 CD25 抗体和 PE-Cy5 标记的 FOXP3 抗体,同型对照管中加入 FITC 标记的 CD4 抗体、PE Rat IgG1 iso 和 PE-Cy5 Rat IgG2α

图1 正常小鼠(上)和荷瘤小鼠(下)脾脏中 FOXP3<sup>+</sup>在 CD4<sup>+</sup>T 细胞中的表达  
图2 小鼠乳腺癌动物模型 CD25<sup>+</sup>在 CD4<sup>+</sup>T 细胞的表达  
图3 小鼠乳腺癌动物模型 CD25<sup>+</sup>和 FOXP3<sup>+</sup>在 CD4<sup>+</sup>T 细胞的表达  
图4 小鼠乳腺癌动物模型 CD25<sup>+</sup>和 FOXP3<sup>+</sup>在 CD4<sup>+</sup>T 细胞的表达  
图5 肿瘤组织中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>(A)和 CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>(B)在 T 细胞中表达

### 2.3 脾脏和淋巴结中 FOXP3<sup>+</sup> 在 CD4<sup>+</sup>T 细胞中的表达

在小鼠乳腺癌动物模型中,荷瘤组小鼠脾脏中 FOXP3<sup>+</sup> 在 CD4<sup>+</sup>T 细胞中表达均较正常对照组升高( $P<0.05$ ),但在荷瘤 1 周和荷瘤 3 周时表达差异无统计学意义( $P>0.05$ )。在荷瘤组小鼠引流淋巴结中 FOXP3<sup>+</sup> 在 CD4<sup>+</sup>T 细胞中表达均较正常对照组升高( $P<0.05$ ),并随荷瘤时间延长而不断增加,其趋势与淋巴结中 CD25<sup>+</sup> 在 CD4<sup>+</sup>T 细胞的表达的趋势相似( $P<0.05$ ),见图 3。

### 2.4 脾脏和淋巴结中 CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> 在 CD4<sup>+</sup>T 细胞中的表达

小鼠乳腺癌动物模型中 CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> 双阳在 CD4<sup>+</sup>T 细胞中的表达与 CD25<sup>+</sup> 在 CD4<sup>+</sup>T 细胞的表达结果相近。在脾脏中,荷瘤组小鼠的表达均较正常对照组增多( $P<0.05$ ),荷瘤 1 周和荷瘤 3 周两组间比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),荷瘤 6 周时较前 3 组增多,但与荷瘤 1 周时比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )(图 4)。在引流淋巴结中,随着荷瘤时间延长,CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> 在 CD4<sup>+</sup>T 细胞中的表达较正常对照组明显增多,除荷瘤 1 周与正常对照两组比较差异无统计学意义外( $P>0.05$ ),其余任意两组间比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ )(图 4)。

### 2.5 肿瘤组织中调节性 T 细胞的表达

首先,检测小鼠乳腺癌实验动物模型荷瘤 1 周和荷瘤 3 周时肿瘤组织中 CD4<sup>+</sup>T 细胞在肿瘤浸润 T 淋巴细胞(CD3<sup>+</sup>T)中的表达,结果表明,在荷瘤 3 周( $19.43\% \pm 12.09\%$ )时较荷瘤 1 周( $3.95\% \pm 2.17\%$ )时其比例增多( $P<0.05$ )。其次,CD25<sup>+</sup> 在 CD4<sup>+</sup>T 细胞中的比例在荷瘤 1 周和 3 周比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。FOXP3<sup>+</sup> 在 CD4<sup>+</sup>T 细胞中表达在荷瘤 3 周( $24.79\% \pm 8.62\%$ )时较荷瘤 1 周( $22.79\% \pm 4.53\%$ )稍增加,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。最后,检测小鼠乳腺癌实验动物模型荷瘤 1 周和荷瘤 3 周肿瘤组织中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 和 CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞在肿瘤浸润 T 淋巴细胞(CD3<sup>+</sup>T)中的表达,检测结果显示,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞在肿瘤浸润 T 淋巴细胞 CD3<sup>+</sup>T 中的表达在荷瘤 3 周( $5.4\% \pm 3.58\%$ )时较荷瘤 1 周( $0.93\% \pm 0.3\%$ )时增高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> 在肿瘤浸润 T 淋巴细胞 CD3<sup>+</sup>T 中的变化趋势与前者相似(图 5)。

## 3 讨论

肿瘤发生发展的重要机制是机体免疫调节的异常。免疫系统与肿瘤相互作用的两个方面包括:①肿瘤免疫排斥,针对肿瘤相关抗原(TAAs)的特异性 T 细胞对肿瘤的杀伤作用是其重要方面,并且这种特异性 T 细胞在晚期肿瘤依然存在<sup>[5,9]</sup>;②肿瘤免疫耐受,机制包括抗原产生和递呈的丢失、分泌免疫抑制因子、免疫抑制细胞的聚集<sup>[10,11]</sup>,如调节性 T 细胞。近年来的研究发现,机体对肿瘤固有的免疫排斥是有限的,而肿瘤诱导的免疫耐受是其存在的重要方面,Tregs 又在肿瘤免疫耐受的过程中起到重要作用。

Tregs 是具有免疫抑制和免疫无能的一种 T 细胞亚型,占外周 CD4<sup>+</sup>T 细胞的 5%~10%,主要来源于胸腺,部分由 IL-10、TGF- $\beta$  等细胞因子诱导或抗原提呈细胞刺激产生。经典的 Treg 是 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>Tregs,FOXP3 是目前公认的 Tregs 最敏感的标志。大量研究证实负载肿瘤的机体 Tregs 的数量较正常情况下会增多<sup>[4]</sup>,且 Tregs 的数量与一些恶性肿瘤的预后呈负相关,如肺癌、卵巢癌、乳腺癌和胃癌等<sup>[5-7,12]</sup>。因此抑制或消除 Tregs 已成为肿瘤免疫治疗研究的重要方面<sup>[13]</sup>。目前 Tregs 在肿瘤患者不同部位的变化研究尚存在争议,如 Ménétrier-caux 等<sup>[11]</sup>研究发现 Tregs 在乳腺癌引流淋巴结中聚集并对患者的生存有消极的影响,而并非在肿瘤组织中。而 Curiel 等<sup>[5]</sup>研究发现,在晚期卵巢癌患者,Tregs 与肿瘤预后呈负相关,并且在肿瘤局部和患者的腹水中大量聚集,而很少迁移至引流淋巴结中。

本实验通过建立小鼠乳腺癌实验动物模型,在 3 个不同的时间点检测 Tregs 在脾脏、引流淋巴结和肿瘤组织中的动态变化。机体免疫稳态的维持要靠 CD3、CD4 和 CD8 细胞之间维持一定的比例,在小鼠乳腺癌动物模型中,以肿瘤接种后 3 周脾脏和淋巴结细胞粗略计数结果为例,每只正常小鼠脾脏总细胞数约  $1 \times 10^8$ ,每只肿瘤小鼠脾脏总细胞数约  $5 \times 10^8 \sim 8 \times 10^8$ ;每只正常小鼠单个淋巴结细胞总数为  $2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ ,每只荷瘤小鼠肿瘤引流淋巴结细胞总数约  $1 \times 10^7$ ,荷瘤组小鼠脾脏和淋巴结中总细胞数均较正常对照组增多,所以在荷瘤小鼠脾脏和淋巴结中 CD4<sup>+</sup>T 细胞的总数量不减少反而增多,但是 CD4<sup>+</sup>T 细胞在淋巴细胞中所占的比例较正常对照组降低。而在肿瘤组织中,CD4<sup>+</sup>T 细胞

在肿瘤浸润 T 淋巴细胞(CD3<sup>+</sup> T)中所占的比例在荷瘤 3 周时明显高于荷瘤 1 周。上述结果说明荷瘤小鼠原有的免疫平衡被破坏,很可能与肿瘤的免疫耐受相关。由于小鼠荷瘤 6 周时,流式检测结果不理想,故在此只给出荷瘤 1 周和荷瘤 3 周时的检测结果。

CD4<sup>+</sup> TCD25<sup>+</sup> 细胞在脾脏和淋巴结中所占 CD4<sup>+</sup> T 细胞的比例随荷瘤时间延长而明显增多;在肿瘤组织浸润的 T 淋巴细胞(CD3<sup>+</sup> T)中,CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> 调节性 T 细胞的表达在荷瘤 3 周较荷瘤 1 周浸润增多。脾脏和淋巴结中 CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> 双阳在 CD4<sup>+</sup> T 细胞中的表达结果与 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T 细胞在 CD4<sup>+</sup> T 细胞中表达结果很相似。上述结果说明,在小鼠恶性乳腺癌动物模型中,Tregs 的数量随小鼠荷瘤时间的延长而在脾脏、淋巴结和肿瘤组织中都有不同程度的富集现象。

FOXP3 作为 Tregs 特异性的标志,与其功能密切相关<sup>[14,15]</sup>,CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> T 细胞在 CD4<sup>+</sup> T 细胞的比例在淋巴结和脾脏中总的变化趋势是随着荷瘤时间延长而明显增多,尤其是在引流淋巴结中增加更为明显。因此在小鼠乳腺癌实验动物模型中,荷瘤小鼠体内,尤其是引流淋巴结中 Tregs 的数量明显增加,因此 Tregs 很可能在诱导肿瘤免疫耐受的过程中发挥了重要作用,促进肿瘤的发展。

总之,Tregs 在很多恶性肿瘤的发生发展中有重要意义,对其在肿瘤动物模型中的变化进行动态检测,有助于深入理解其在肿瘤发展中的变化机制,为后续抑制 Tregs 的肿瘤免疫治疗研究寻找合适的动物模型。由于本实验只是对 Tregs 进行了定量的流式检测,未对其功能和与肿瘤发生的机制做更进一步研究,这是本实验的局限性。希望本实验能为进一步研究针对诱导 Tregs 在肿瘤机体凋亡、无能和迁移的免疫治疗打下基础。

\* \* \*

致谢:本研究部分科研经费由“长江学者和创新团队发展计划”(PCSIRT),编号为 IRT0935 资助,特此致谢。

参 考 文 献

1 Leong PP, Mohammad R, Ibrahim N, *et al.* Phenotyping of lymphocytes expressing regulatory and effector markers in

infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Immunol Lett*, 2006;102(2):229-236.

2 李金星, 高伟, 张春来. 乳腺癌患者外周血调节性 T 细胞的检测及临床意义. *实用医药杂志*, 2010;27(3):216-217.

3 Watanabe MAE, Oda JMM, Amarante MK, *et al.* Regulatory T cells and breast cancer: implications for immunopathogenesis. *Cancer Metastasis Rev*, 2010;29:569-579.

4 Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 2006;6(4):295-308.

5 Curiel TJ, Coukos G, Zou L, *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*, 2004;10(9):942-949.

6 Petersen RP, Campa MJ, Sperlazza J, *et al.* Tumor infiltrating Foxp3<sup>+</sup> regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer*, 2006;107(12):2866-2872.

7 Nakamura R, Sakakibara M, Nagashima T, *et al.* Accumulation of regulatory T cells in sentinel lymph nodes is a prognostic predictor in patients with node-negative breast cancer. *Eur J Cancer*, 2009;45(12):2123-2131.

8 Perez SA, Karamouzis MV, Skarlos DV, *et al.* CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell frequency in HER-2/neu (HER)-positive and HER-negative advanced-stage breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2007;13(9):2714-2721.

9 Garnett CT, Schlom J, Hodge JW. Combination of docetaxel and recombinant vaccine enhances T cell responses and antitumor activity: effects of docetaxel on immune enhancement. *Clin Cancer Res*, 2008;14(11):3536-3544.

10 Knutson KL, Dang Y, Lu H, *et al.* IL-2 immunotoxin therapy modulates tumor-associated regulatory T cells and leads cancers in neu-transgenic mice to lasting immune-mediated rejection of breast. *J Immunol*, 2006;177(1):84-91.

11 Ménétrier-Caux C, Gobert M, Caux C. Differences in tumor regulatory T-cell localization and activation status impact patient outcome. *Cancer Res*, 2009;69(20):7895-7898.

12 Mizukami Y, Kono K, Kawaguchi Y, *et al.* Localisation pattern of Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells is associated with clinical behaviour in gastric cancer. *Br J Cancer*, 2008;98(1):148-153.

13 Nizar S, Copier J, Meyer B, *et al.* T-regulatory cell modulation: the future of cancer immunotherapy? *Brit J Cancer*, 2009;100(11):1697-1703.

14 Feng LL, Wang X. Targeting Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells-related immunosuppression for cancer immunotherapy. *Chin Med J*, 2010;123(22):3334-3342.

15 Gupta S, Joshi K, Wig JD, *et al.* Intratumoral FOXP3 expression in infiltrating breast carcinoma: its association with clinicopathologic parameters and angiogenesis. *Acta Oncologica*, 2007;46(6):792-797.

(2012-03-02 收稿, 2012-06-29 修回)

编辑 吕熙