

血清IL-12及IFN- γ 在乳腺癌新辅助化疗疗效评估中的研究

刘祖格^{1*}, 于伟康^{1*}, 曹伟红², 毛艳², 王琳², 孔滨^{2#}

¹青岛大学医学院, 山东 青岛

²青岛大学附属医院乳腺外科, 山东 青岛

收稿日期: 2025年1月28日; 录用日期: 2025年2月21日; 发布日期: 2025年2月28日

摘要

目的: 利用生信分析探讨细胞因子IL-12及IFN- γ 对乳腺癌患者免疫微环境的影响, 并结合临床病理特征, 对其评估新辅助化疗疗效的价值进行研究。方法: 在基因表达综合(GEO)数据库中下载GSE163882, 比较IL-12相对应基因IL12B及IFN- γ 相对应基因IFNG在病理完全缓解(pCR)患者和残留病灶(RD)患者中的表达。收集于我院接受新辅助化疗的50例乳腺癌患者的临床资料, 使用卡方检验分析临床病理特征与新辅助化疗疗效的相关性; 通过ROC曲线评估血清IL-12、IFN- γ 的预测价值, 并且确定最佳截断值; 采用二元Logistic回归进行多因素分析。通过ssGSEA免疫浸润分析IL12B和IFNG与免疫细胞浸润的相关性; 采用GO和KEGG功能富集分析, 探讨相关基因潜在生物学功能及信号通路。结果: 在GEO数据库GSE163882数据集中IL12B和IFNG在pCR患者中呈现高表达。于我院收治的临床患者中pCR患者化疗前血清IL-12和IFN- γ 水平明显高于非pCR组($P < 0.05$); 单因素分析显示, 新辅助化疗后pCR与腋窝淋巴结转移、PR表达、Her-2表达及血清IL-12和IFN- γ 表达状态显著相关($P < 0.05$); 多因素Logistic分析显示, 化疗前血清IFN- γ 水平是新辅助化疗疗效的独立影响因素。免疫浸润分析显示, 活化CD4 T细胞、活化CD8 T细胞、活化B细胞和自然杀伤细胞在pCR患者中高度浸润。结论: 血清IL-12和IFN- γ 表达状态与新辅助化疗效果具有相关性, 化疗前血清IFN- γ 高表达是pCR的独立预测因子。

关键词

乳腺癌, IL12, IFN γ , 新辅助化疗(NAC), pCR

Evaluation of Efficacy of Serum IL-12 and IFN- γ in Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer

Zuge Liu^{1*}, Weikang Yu^{1*}, Weihong Cao², Yan Mao², Lin Wang², Bin Kong^{2#}

*共同第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 刘祖格, 于伟康, 曹伟红, 毛艳, 王琳, 孔滨. 血清IL-12及IFN- γ 在乳腺癌新辅助化疗疗效评估中的研究[J]. 临床医学进展, 2025, 15(2): 1839-1849. DOI: 10.12677/acm.2025.152543

¹Medical College of Qingdao University, Qingdao Shandong

²Department of Breast Surgery, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

Received: Jan. 28th, 2025; accepted: Feb. 21st, 2025; published: Feb. 28th, 2025

Abstract

Objective: To investigate the effects of cytokines IL-12 and IFN- γ on the immune microenvironment of breast cancer patients by means of Bioinformatics analysis, and to study their value in evaluating the efficacy of neoadjuvant chemotherapy combined with clinicopathological characteristics. **Methods:** GSE163882 was downloaded from the Gene Expression Omnibus database, and the expressions of IL-12 corresponding gene IL12B and IFNG corresponding gene IFN- γ were compared in pathologic complete response patients and residual lesion patients. The clinical data of 50 breast cancer patients who received neoadjuvant chemotherapy at The Affiliated Hospital of Qingdao University were collected. Chi-square test was used to analyze the correlation between clinicopathological features and the efficacy of neoadjuvant chemotherapy. The predictive value of serum IL-12 and IFN- γ was evaluated by ROC curve. Multivariate analysis was performed by binary Logistic regression. The correlation between IL12B and IFNG and immune cell infiltration was analyzed by ssGSEA immunoinfiltration. GO and KEGG functional enrichment analysis were used to explore the potential biological functions and signaling pathways of related genes. **Results:** IL12B and IFNG were highly expressed in pCR patients in the GSE163882 dataset. The serum levels of IL-12 and IFN- γ in pCR patients before chemotherapy were significantly higher than those in non-PCR group ($P < 0.05$). Univariate analysis showed that pCR was significantly correlated with axillary lymph node metastasis, PR expression, Her-2 expression and serum IL-12 and IFN- γ expression after neoadjuvant chemotherapy ($P < 0.05$). Multivariate Logistic analysis showed that serum IFN- γ level before chemotherapy was an independent factor influencing the efficacy of neoadjuvant chemotherapy. Immunoinfiltration analysis showed that activated CD4 T cells, activated CD8 T cells, activated B cells, and natural killer cells were highly infiltrated in pCR patients. **Conclusion:** The expression of serum IL-12 and IFN- γ is correlated with the effect of neoadjuvant chemotherapy, and the high expression of serum IFN- γ before chemotherapy is an independent predictor of pCR.

Keywords

Breast Cancer, IL-12, IFN- γ , Neoadjuvant Chemotherapy, Pathologic Complete Response

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 介绍

在女性恶性肿瘤中, 乳腺癌(Breast cancer)的发病率排在第一位[1]。新辅助化疗(Neoadjuvant chemotherapy, NAC)能够降期保乳, 并允许手术降低局部晚期 BC 患者肿瘤恶性程度[2]。手术前进行 NAC 以减小肿瘤负荷并评估 BC 对治疗的敏感性[3], 新辅助治疗后达到病理完全缓解(pCR)的患者无事件生存率明显优于残留病灶(RD)的患者[4]。临床上术前 NAC 疗效评估主要是通过乳腺磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)、乳腺 X 线检查、超声(ultrasonography, US)和 PET/CT 检查等间接评价[5]。但传统的影像学方法对 NAC 反应的评估具有局限性。Andrea Nicolini 研究表明, 细胞因子, 主要是白细胞介素-12 和干扰素, 直接和/或通过抗雌激素协同作用表现出抗肿瘤作用。它们已被单独用于晚期乳腺癌, 或与

其他免疫调节因子或药物联合用于免疫学治疗方法[6]。但目前很少有研究表明 IL-12 和 IFN- γ 是否可以作为生物标志物, 用于乳腺癌新辅助化疗疗效评估。IL-12 被认为是一种有效的抗癌剂。IL-12 能够激活自然杀伤(NK)细胞和 T 细胞, 诱导干扰素 γ (IFN- γ)产生。IFN- γ 在细胞免疫的激活和随后的抗肿瘤免疫反应刺激中起关键作用[7]。因此本研究通过生信分析与临床相结合的方式探讨血清 IL-12 和 IFN- γ 与乳腺癌新辅助化疗疗效的相关性, 从而为 NAC 治疗提供更为精准的个体化支持。

2. 材料与方法

2.1. 数据准备与预处理

GSE163882 的原始数据从基因综合表达(GEO)数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)下载[8]。该数据集包含 222 例接受 NAC 治疗的 BC 患者, HER2 阴性患者 159 例, HER2 阳性患者 63 例。应用 R 软件的 limma 包比较 pCR 和 RD 患者的相关差异表达基因(DEGs), GSE123845 为本研究中的独立外部测试集。

2.2. 标本采集与分析

2.2.1. 一般资料

经青岛大学附属医院伦理委员会知情同意并批准, 病人均对研究知情同意。研究对象为青岛大学附属医院于 2022 年 3 月至 2024 年 4 月收治的 50 名接受新辅助化疗的女性乳腺癌患者, 年龄 26~75 岁, 平均年龄(49.1 ± 12.4)岁。

病例纳入标准: 1) 经空心针穿刺活检病理诊断为乳腺癌; 2) 于我院完整接受 4~8 周期标准新辅助化疗; 3) 临床病理资料完整; 4) TNM 分期为 II-III 期。排除标准: 1) 合并第二肿瘤; 2) 患有血液系统、免疫系统及感染性相关疾病; 3) 新辅助化疗前接受任何形式的抗肿瘤治疗。

2.2.2. 病理指标

采用免疫组化评价 ER、PR、HER2、Ki67 的表达状态。将 ER 阳性和 PR 阳性均定义为肿瘤细胞核染色 $\geq 1\%$ [9]; HER2 阳性定义为免疫组化染色+++或免疫荧光原位杂交(florescent in situ hybridization, FISH)检测阳性; Ki67 阳性判断标准以高倍镜下计数 1000 个细胞, 阳性细胞计数 $< 30\%$ 为低表达, $\geq 30\%$ 为高表达; 腋窝淋巴结转移定义为化疗前空心针穿刺示腋窝淋巴结内见癌转移。

2.2.3. 血清 IL-12 及 IFN- γ 检测

细胞因子测定 NAC 治疗前 7 天内, 采取患者空腹状态下静脉血样 3~5 ml, 4 小时内离心分离血清, 应用 RaiseCyte2L6C 流式细胞仪, 通过多重微球流式免疫荧光发光法测定患者血清 IL-12 及 IFN- γ 含量, 试剂盒来源于青岛瑞思凯尔生物科技有限公司。

2.2.4. NAC 疗效评价

参照 Miller-Payne 分级标准: 1 级浸润癌细胞基本无改变, 肿瘤细胞数量总体上未减少; 2 级浸润癌细胞轻度减少, 减少 $\leq 30\%$; 3 级浸润癌细胞减少 30%~90%; 4 级癌细胞显著减少 $> 90\%$; 5 级原肿瘤床部位未见癌细胞浸润, 但可存在导管原位癌。及 RCB(residual cancer burden)评估系统: RCB0 即 pCR, 表示浸润病灶已达到完全缓解; RCB I 浸润病灶少量残留, 部分缓解; RCB II 浸润病灶中度残留, 部分缓解; RCB III 广泛病灶残留。本研究将 pCR 定义为乳腺原发灶无浸润性癌(可存在导管原位癌)且无腋窝淋巴结转移, 即原发灶 MP5 级和 RCB 分级 0 级。

2.3. 免疫浸润分析

我们使用 GSEABase 和 GSVA [10]包的单样本基因集富集分析(ssGSEA)鉴别 GSE163882 数据集中

pCR 和 RD 患者 28 种免疫细胞的丰度。

2.4. 基因富集分析

采用 R 软件 clusterProfiler 包进行基因本体(GO)功能注释分析以及京都基因和基因组百科全书 (KEGG)通路分析, 发现了 DEGs 的功能作用, $P < 0.05$, 错误发现率(FDR) < 0.05 认为有统计学意义。

2.5. 统计学分析

采用 R (4.3.1 版)和 SPSS 25.0 软件进行统计分析。采用 Spearman 方法比较 IL12B 和 IFNG 的相关性。采用 Wilcoxon 检验分析细胞因子与 NAC 疗效的相关性。采用卡方检验分析临床病理指标与 pCR 的相关性; ROC 曲线图分析法确定 IL-12 及 IFN- γ 对 NAC 疗效预测的最佳截断值; 多因素分析采用二元 Logistic 回归。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3. 结果

3.1. IL12B 和 IFNG 表达分析

利用 GEO 数据库 GSE163882 数据集中的基因表达谱和临床信息对病理完全缓解(pCR)患者和残留病灶(RD)患者进行 Wilcoxon 秩和检验。pCR 患者中 IL12B 和 IFNG 表达均高于 RD 患者, 见图 1、图 2。我们研究了 IL12B 和 IFNG 基因的 Spearman 相关性, 发现二者呈正相关($R = 0.70$, $P = 2.62e-159$), 见图 3。通过 GSE123845 数据集作为外部验证, 见图 4, 图 5。

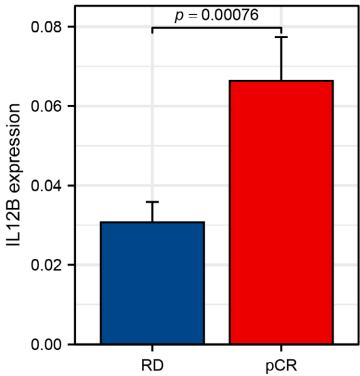


Figure 1. Comparison of IL12B expression between pCR and RD tissues
图 1. pCR 与 RD 中 IL12B 表达的比较

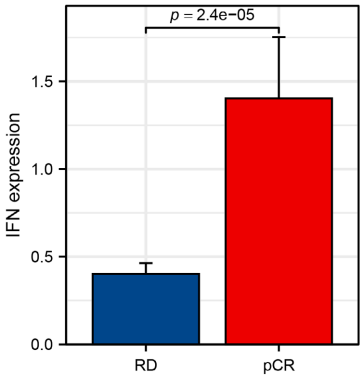


Figure 2. Comparison of IFNG expression between pCR and RD tissues
图 2. pCR 与 RD 中 IFNG 表达的比较

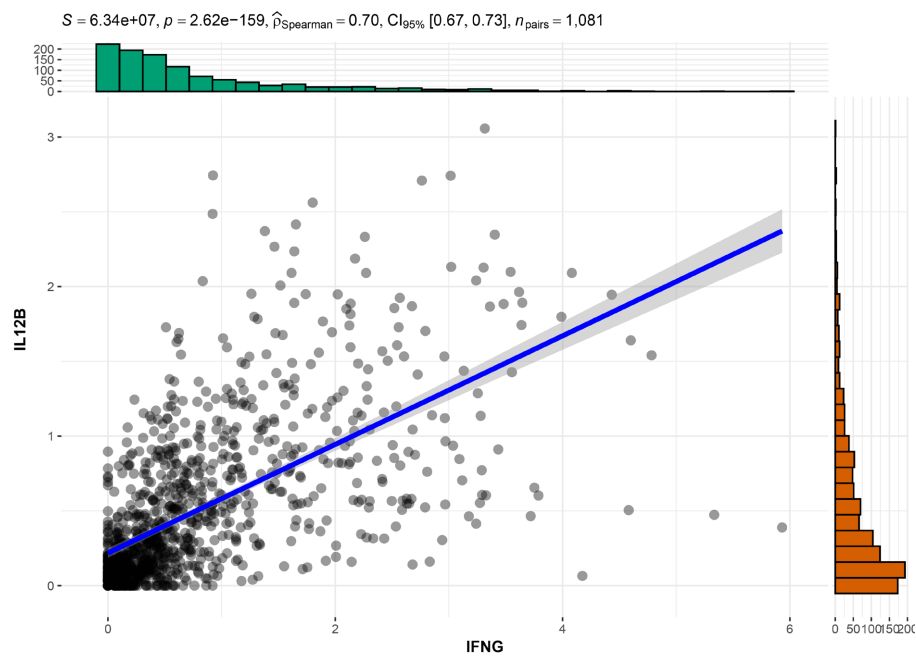


Figure 3. Association between IL12B and IFNG expression
图 3. IL12B 与 IFNG 表达的关系

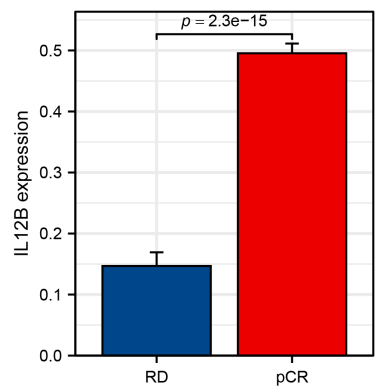


Figure 4. Comparison of IL12B expression between pCR and RD tissues
图 4. pCR 与 RD 中 IL12B 表达的比较

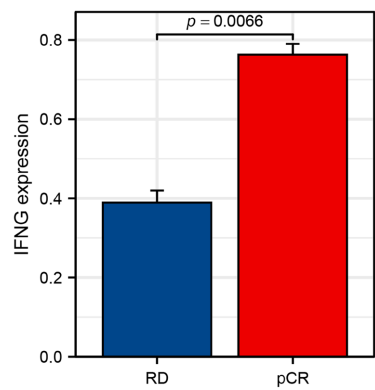


Figure 5. Comparison of IFNG expression between pCR and RD tissues
图 5. pCR 与 RD 中 IFNG 表达的比较

3.2. 临床数据分析

本研究共纳入 50 例研究对象, 新辅助治疗后病理评估达到 pCR 者 14 例(28.0%), 非 pCR 者 36 例(72.0%)。

3.2.1. 血清 IL-12、IFN- γ 水平与新辅助化疗疗效的相关性

pCR 者化疗前血清 IL-12 水平明显高于非 pCR 者, 差异具有统计学意义($W = 167.5, P = 0.001$); pCR 者化疗前血清 IFN- γ 水平显著高于非 pCR 者, 差异具有统计学意义($W = 694.5, P = 0.001$), 表 1。

Table 1. Relationship between serum IL-12, IFN- γ levels and adjuvant chemotherapy for breast cancer

表 1. 血清 IL-12、IFN- γ 水平与乳腺癌新辅助化疗疗效的关系

细胞因子	pg/ml		W	P
	pCR	非 pCR		
IL-12	1.30 $\pm$ 0.47	0.83 $\pm$ 0.18	167.5	0.001
IFN- γ	5.39 $\pm$ 4.24	1.85 $\pm$ 0.63	694.5	0.001

3.2.2. 血清 IL-12、IFN- γ 预测乳腺癌新辅助化疗疗效

血清 IL-12 与新辅助化疗疗效的 ROC 曲线下面积为 0.842, 血清 IL-12 的最佳截断值为 0.955, 此时其预测 pCR 的灵敏度为 0.571, 特异度为 0.889, 见图 6; 血清 IFN- γ 与新辅助化疗疗效的 ROC 曲线下面积为 0.943, 血清 IFN- γ 的最佳截断值为 2.895, 此时其预测 pCR 的灵敏度为 0.786, 特异度为 0.944, 见图 7。根据其最佳截断值将患者分为高表达组和低表达组。

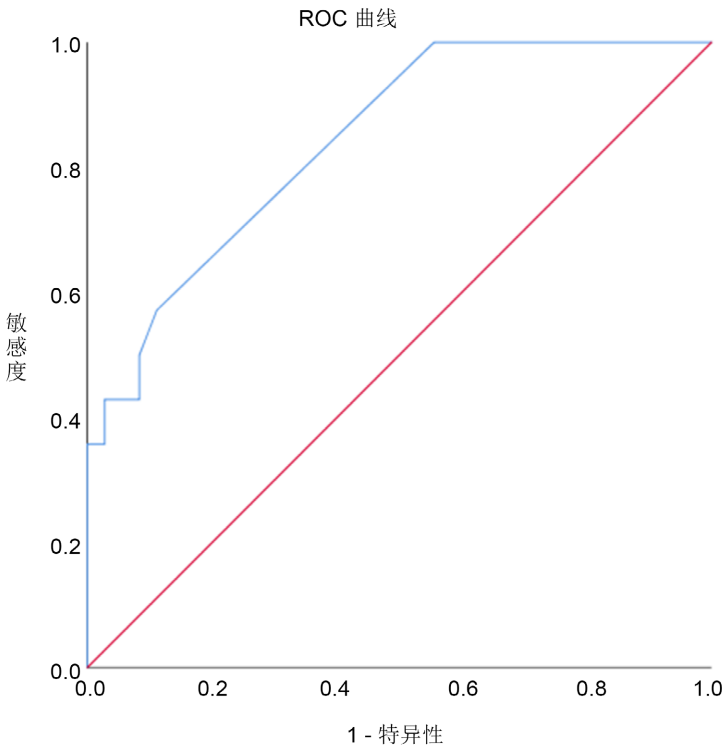


Figure 6. ROC curve of serum IL-12 level predicting pCR in breast cancer before chemotherapy

图 6. 化疗前乳腺癌血清 IL-12 水平预测 pCR 的 ROC 曲线

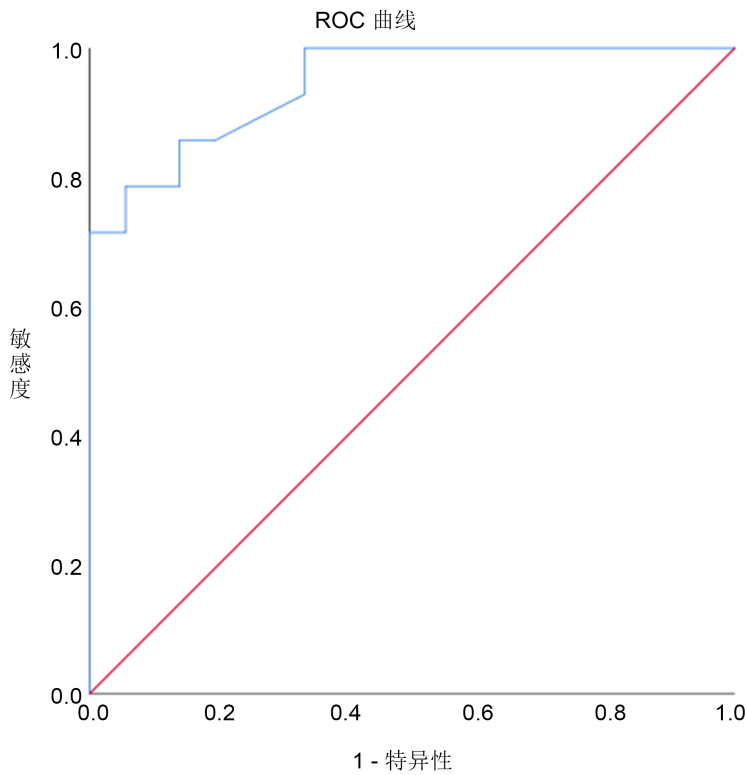


Figure 7. ROC curve of serum IFN- γ level predicting pCR in breast cancer before chemotherapy
图 7. 化疗前乳腺癌血清 IFN- γ 水平预测 pCR 的 ROC 曲线

3.2.3. 临床病理特征与乳腺癌 NAC 疗效的关系

单因素结果分析显示，NAC 后 pCR 与腋窝淋巴结转移，PR 表达、Her-2 表达及血清 IL-12、IFN- γ 表达显著相关($P < 0.05$)，见表 2。

Table 2. Relationship between clinicopathological features and NAC efficacy in breast cancer [Case (%)]
表 2. 临床病理特征与乳腺癌 NAC 疗效的关系[例(%)]

临床指标		n	pCR	非 pCR	χ^2	P
年龄	< 50	21	6	15	0.196	0.658
	≥ 50	29	10	19		
腋窝淋巴结转移	是	28	1	27	18.837	0.001
	否	22	13	9		
TNM 分期	II	27	9	18	0.828	0.363
	III	23	5	18		
ER	阳性	37	8	29	1.784	0.182
	阴性	13	6	7		
PR	阳性	33	5	28	10.19	0.001
	阴性	17	10	7		
Her-2	阳性	18	10	8	10.593	0.001
	阴性	32	4	28		

续表

Ki-67	< 30%	33	6	27	3.319	0.068
	≥ 30%	17	8	9		
血清 IL-12	高表达	14	9	5	10.322	0.001
	低表达	36	5	31		
血清 IFN- γ	高表达	13	11	2	24.265	0.001
	低表达	37	3	34		

3.2.4. 影响乳腺癌患者 NAC 疗效的多因素分析

将乳腺癌患者 NAC 疗效设置为因变量, 将血清 IL-12 及 IFN- γ 表达水平设置为自变量, 纳入二元 Logistic 回归分析, 结果示: IFN- γ 高表达为乳腺癌患者 NAC 疗效的保护因素($P < 0.05$), 见表 3。

Table 3. Multivariate Logistic regression analysis on the effect of NAC in breast cancer patients

表 3. 影响乳腺癌患者 NAC 疗效的多因素 Logistic 回归分析

指标	β	SE	Wald χ^2	P 值	OR (95%CI)
血清 IL-12	1.299	0.732	3.153	0.076	3.667 (0.874~15.384)
血清 IFN- γ	1.368	0.683	4.010	0.045	3.929 (1.029~14.992)

3.3. 免疫浸润比较

为了更好地了解免疫功能的差异, 我们将 IL12B 及 IFNG 差异基因进行了 ssGSEA。在检查的 28 种免疫细胞类型中, 与 RD 患者相比, 15 种免疫细胞类型在 pCR 患者中表现出高浸润, 包括活化 CD4 T 细胞、活化 CD8 T 细胞、活化 B 细胞和自然杀伤细胞等, 见图 8。

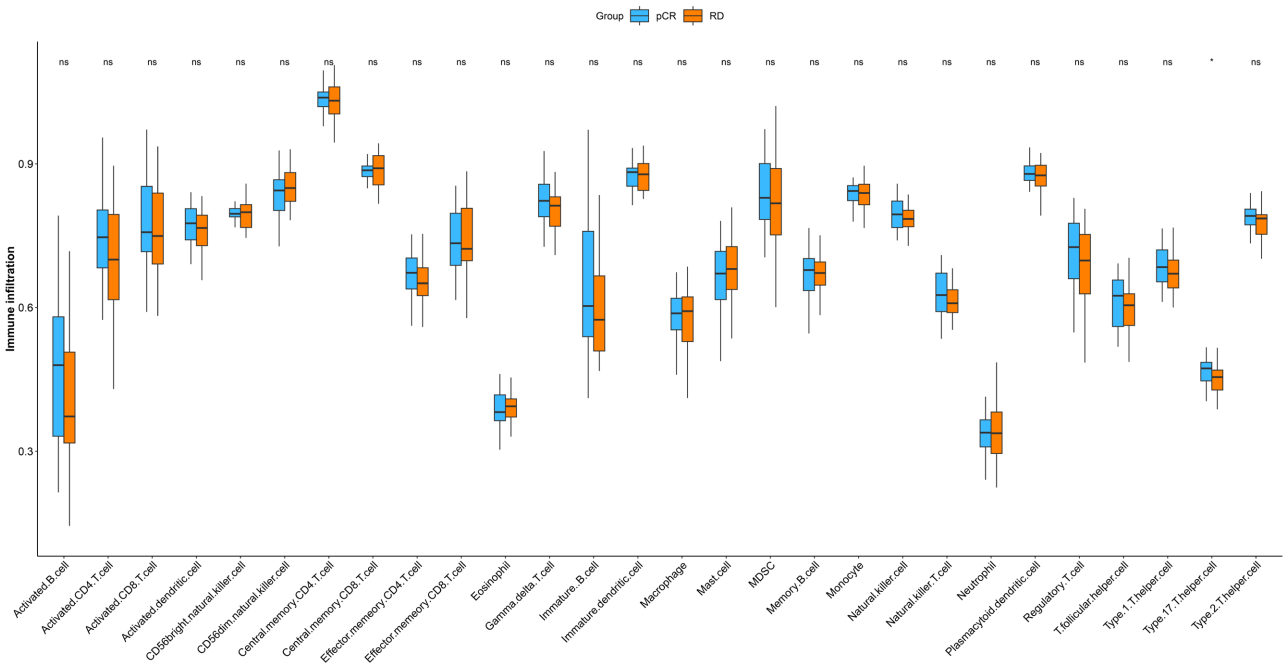


Figure 8. A boxplot of the immune cell infiltration levels in RD and pCR patients

图 8. RD 和 pCR 患者免疫细胞浸润水平的箱线图

3.4. 功能分析

采用 GO 和 KEGG 功能富集分析，探讨 IL12B 及 IFNG 差异基因潜在生物学功能及信号通路。GO 分析结果显示：在生物过程水平，差异基因在：1) 细胞杀伤功能；2) 淋巴细胞介导免疫；3) 趋化因子介导的信号通路；4) 单核细胞分化；5) 自然杀伤细胞介导免疫方面显著富集，见图 9。KEGG 通路分析结果表明，差异基因主要参与细胞因子与细胞因子受体相互作用、病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体相互作用、IL17 信号通路、趋化因子信号通路、自然杀伤细胞介导的细胞毒性相关通路，见图 10。

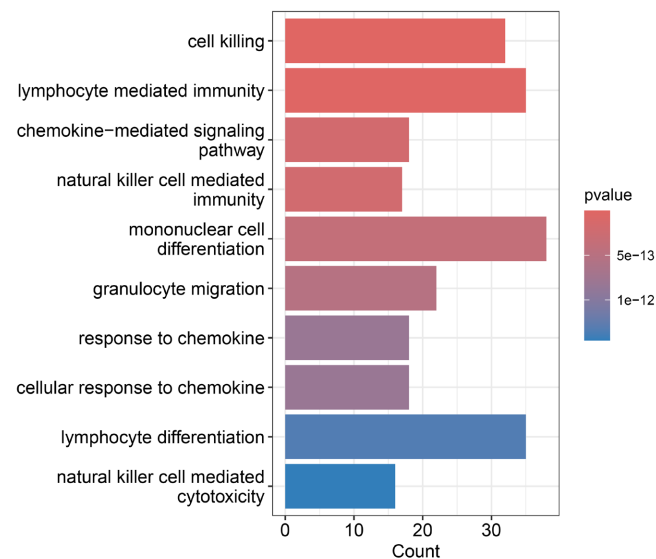


Figure 9. GO enrichment analysis of IL12B and IFNG differential genes
图 9. IL12B 及 IFNG 差异基因的 GO 富集分析

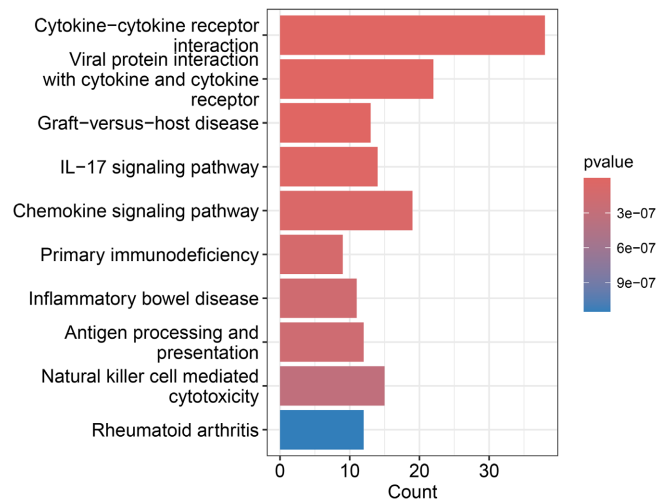


Figure 10. A Histogram of the top 10 KEGG signaling pathways
图 10. 前 10 个 KEGG 信号通路的柱状图

4. 讨论

乳腺癌患者人数在逐年递增。近年来免疫治疗在乳腺癌治疗领域迈进了一大步，肿瘤微环境是癌细

胞重要生存环境,更是免疫治疗的重要研究方向[11]。细胞因子是肿瘤微环境中对肿瘤细胞和免疫细胞均有影响的重要组成成分。

人白细胞介素 12 (IL-12)是一种由树突状细胞和活化的吞噬细胞产生的促炎细胞因子[12]。作为一种异二聚体细胞因子,可增强辅助性 T 细胞 1 (Th1)的分化并促进 T 细胞介导的癌细胞细胞溶解[13],以及抑制肿瘤血管生成。JAK2 和 JAK1 或 TYK2 介导 IL-12 细胞因子受体家族相关 STAT 的磷酸化[14]。IL12 能够激活自然杀伤(NK)细胞和 T 细胞,诱导干扰素 γ (IFN- γ)产生[15]。反过来, IFN- γ 可以直接杀死肿瘤细胞,抑制血管生成,刺激 NK 细胞、CTL 和巨噬细胞,同时上调肿瘤细胞表面的 MHC I 和 II 分子[16]。在临床研究中, IL-12 已被评估为多种恶性肿瘤的实验性治疗方法。IL-12 还被证明能够诱导 T 细胞淋巴瘤、艾滋病相关卡波西肉瘤和非霍奇金淋巴瘤的高效抗肿瘤反应[6]。

干扰素- γ (IFN- γ)是由 IFNG 基因编码的蛋白质,是一种具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调控作用的多效性细胞因子[17],能够抑制正常细胞和转化细胞的增殖。IFN- γ 还可增强抗原呈递,提高肿瘤细胞对 CTL (细胞毒性 T 淋巴细胞)和 NK 细胞的易感性直接杀伤肿瘤细胞。重组 IFN- γ (如 Actimmune)已用于治疗某些疾病,如慢性肉芽肿病(CGD)和恶性骨质疏松症[18]。

本文通过 GEO 数据库的分析,首先发现了 IL12B 和 IFNG 在 pCR 患者中高表达。然后,通过临床数据验证血清 IL-12 及 IFN- γ 在 pCR 患者中高表达有明显统计学意义,数据提示 IL-12、IFN- γ 可能作为乳腺癌新辅助化疗疗效评估的潜在生物标记。随后通过 ssGSEA 免疫浸润分析显示活化 CD4 T 细胞、活化 CD8 T 细胞、活化 B 细胞和自然杀伤细胞在 pCR 患者中高度浸润。IL-12、IFN- γ 在乳腺癌 NAC 疗效评价方面资料较少,准确评估对 NAC 的反应是影响治疗决策的关键因素[19]。本次研究数据提示血清 IL-12 及 IFN- γ 水平的升高可能反映了机体对化疗药物的良好反应及肿瘤细胞的免疫清除作用。

综上所述,血清 IL-12 及 IFN- γ 水平在乳腺癌新辅助化疗疗效评估中具有重要的预测价值。未来研究可进一步探讨这些免疫因子在肿瘤免疫微环境中的作用机制,以及联合其他生物标志物提高乳腺癌化疗疗效评估的准确性。

5. 研究的局限性

研究包括样本量小,未随访患者生存情况,无法进行生存分析,未涉及 NAC 前后细胞因子表达变化。随着样本量的扩大,课题组将不断完善与手术相关的各项指标,并不断扩大随访内容,延长随访时间。期望 IL12 及 IFN γ 对乳腺癌患者新辅助疗效的评估等做出更客观的评价。

参考文献

- [1] Farkas, A.H. and Nattinger, A.B. (2023) Breast Cancer Screening and Prevention. *Annals of Internal Medicine*, **176**, ITC161-ITC176. <https://doi.org/10.7326/aitc202311210>
- [2] Cantini, L., Trapani, D., Guidi, L., Boscolo Bielo, L., Scafetta, R., Koziej, M., *et al.* (2024) Neoadjuvant Therapy in Hormone Receptor-Positive/HER2-Negative Breast Cancer. *Cancer Treatment Reviews*, **123**, Article 102669. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2023.102669>
- [3] Yin, G., Liu, L., Yu, T., Yu, L., Feng, M., Zhou, C., *et al.* (2024) Genomic and Transcriptomic Analysis of Breast Cancer Identifies Novel Signatures Associated with Response to Neoadjuvant Chemotherapy. *Genome Medicine*, **16**, Article No. 11. <https://doi.org/10.1186/s13073-024-01286-8>
- [4] Takada, M. and Toi, M. (2020) Neoadjuvant Treatment for HER2-Positive Breast Cancer. *Chinese Clinical Oncology*, **9**, 32-32. <https://doi.org/10.21037/cco-20-123>
- [5] Gu, J., Tong, T., Xu, D., Cheng, F., Fang, C., He, C., *et al.* (2022) Deep Learning Radiomics of Ultrasonography for Comprehensively Predicting Tumor and Axillary Lymph Node Status after Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients: A Multicenter Study. *Cancer*, **129**, 356-366. <https://doi.org/10.1002/cncr.34540>
- [6] Nicolini, A., Carpi, A., Ferrari, P., Mario Biava, P. and Rossi, G. (2016) Immunotherapy and Hormone-Therapy in Metastatic Breast Cancer: A Review and an Update. *Current Drug Targets*, **17**, 1127-1139.

- <https://doi.org/10.2174/1389450117666160201114752>
- [7] Jorgovanovic, D., Song, M., Wang, L. and Zhang, Y. (2020) Roles of IFN- Γ in Tumor Progression and Regression: A Review. *Biomarker Research*, **8**, Article No. 49. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00228-x>
 - [8] Marisa, L., de Reyniès, A., Duval, A., Selves, J., Gaub, M.P., Vescovo, L., *et al.* (2013) Gene Expression Classification of Colon Cancer into Molecular Subtypes: Characterization, Validation, and Prognostic Value. *PLOS Medicine*, **10**, e1001453. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001453>
 - [9] Hammond, M.E., Hayes, D.F., Dowsett, M., *et al.* (2010) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer (Unabridged Version). *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, **134**, e48-e72. <https://doi.org/10.5858/134.7.e48>
 - [10] Hänzelmann, S., Castelo, R. and Guinney, J. (2013) GSEA: Gene Set Variation Analysis for Microarray and RNA-Seq Data. *BMC Bioinformatics*, **14**, Article No. 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-7>
 - [11] Dvir, K., Giordano, S. and Leone, J.P. (2024) Immunotherapy in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, **25**, Article 7517. <https://doi.org/10.3390/ijms25147517>
 - [12] Jia, Z., Ragoonanan, D., Mahadeo, K.M., Gill, J., Gorlick, R., Shpal, E., *et al.* (2022) IL12 Immune Therapy Clinical Trial Review: Novel Strategies for Avoiding CRS-Associated Cytokines. *Frontiers in Immunology*, **13**, Article 952231. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.952231>
 - [13] Nguyen, H., Guz-Montgomery, K. and Saha, D. (2020) Oncolytic Virus Encoding a Master Pro-Inflammatory Cytokine Interleukin 12 in Cancer Immunotherapy. *Cells*, **9**, Article 400. <https://doi.org/10.3390/cells9020400>
 - [14] Vignali, D.A.A. and Kuchroo, V.K. (2012) IL-12 Family Cytokines: Immunological Playmakers. *Nature Immunology*, **13**, 722-728. <https://doi.org/10.1038/ni.2366>
 - [15] Nguyen, K.G., Vrabel, M.R., Mantooth, S.M., Hopkins, J.J., Wagner, E.S., Gabaldon, T.A., *et al.* (2020) Localized Interleukin-12 for Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, **11**, Article 575597. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.575597>
 - [16] Harris, M.A., Savas, P., Virassamy, B., O'Malley, M.M.R., Kay, J., Mueller, S.N., *et al.* (2024) Towards Targeting the Breast Cancer Immune Microenvironment. *Nature Reviews Cancer*, **24**, 554-577. <https://doi.org/10.1038/s41568-024-00714-6>
 - [17] Han, J., Wu, M. and Liu, Z. (2023) Dysregulation in IFN- Γ Signaling and Response: The Barricade to Tumor Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, **14**, Article 1190333. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1190333>
 - [18] Ivashkiv, L.B. (2018) IFN γ : Signalling, Epigenetics and Roles in Immunity, Metabolism, Disease and Cancer Immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, **18**, 545-558. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0029-z>
 - [19] Wang, H. and Mao, X. (2020) Evaluation of the Efficacy of Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer. *Drug Design, Development and Therapy*, **14**, 2423-2433. <https://doi.org/10.2147/dddt.s253961>