

肿瘤相关巨噬细胞分泌转化生长因子- β 诱导蛋白影响胶质瘤干细胞特性的体外研究

朱洪涛 刘丹 陈籽荣 厉亚坤 王震 程芳玲 刘佳敏 张所军 张斌 万锋

【摘要】 目的 探讨转化生长因子- β 诱导蛋白(TGFBI)在胶质母细胞瘤中的异质性表达及其促进胶质瘤干细胞恶性行为的作用机制。方法 检索肿瘤基因组学图谱计划(TCGA)、中国脑胶质瘤基因组图谱计划(CGGA)、脑肿瘤分子数据库(REMBRANDT)、Oncomine 数据库中 TGFBI 在不同级别胶质瘤、不同亚型胶质母细胞瘤中的表达水平,以及 TGFBI 表达变化与患者生存期、胶质瘤相关巨噬细胞(TAMs)标志物 CD11b 和 CD163 的相关性。体外诱导人外周血单核细胞系 U937 分化为 Primed-U937 细胞和 M2 型巨噬细胞样细胞,实时定量聚合酶链反应检测诱导过程中 TGFBI, M1 型 TAMs 标志物 CD80、白细胞介素-6(IL-6),以及 M2 型 TAMs 标志物 CC 趋化因子配体 18(CCL18)、血管内皮生长因子 A(VEGFA)的表达变化。免疫荧光染色和免疫组织化学染色观察胶质母细胞瘤细胞 TGFBI 与 TAMs 标志物 CD163 和胶质瘤干细胞标志物 SOX2 的分布情况。体外培养人原代胶质瘤干细胞系 NCH-421K,测定重组人 TGFBI(rhTGFBI)对细胞成球能力和侵袭能力的影响。**结果** (1)来自 TCGA、CGGA、REMBRANDT、Oncomine 数据库的数据分析显示,TGFBI 表达变化与胶质瘤分级和恶性程度呈正相关,与患者生存期呈负相关,与 TAMs 标志物 CD11b 和 CD163 表达水平呈正相关。(2)在 U937 细胞诱导分化为 M2 型 TAMs 过程中,M1 型 TAMs 标志物 CD80($P=0.000$)和 IL-6($P=0.001$)表达水平降低,M2 型 TAMs 标志物 CCL18($P=0.000$)和 VEGFA($P=0.002$)表达水平升高,TGFBI 表达水平亦升高($P=0.001$)。(3)免疫荧光染色和免疫组织化学染色显示,胶质母细胞瘤细胞中 TGFBI 与 TAMs 标志物 CD163 和胶质瘤干细胞标志物 SOX2 均存在共定位。(4)体外成球实验和侵袭实验显示,经 rhTGFBI 处理后,NCH-421K 细胞成球数目多于($P=0.000$)、细胞球侵袭能力强于($P=0.001$)对照组。**结论** 胶质母细胞瘤 TGFBI 可由 M2 型 TAMs 分泌并促进胶质瘤干细胞成球、侵袭等恶性行为。

【关键词】 胶质母细胞瘤; 巨噬细胞; 转化生长因子 β ; 肿瘤干细胞; 肿瘤细胞,培养的

Tumor - associated macrophages secrete TGFBI to promote malignancy of glioma stem cells in vitro

ZHU Hong-tao¹, LIU Dan², CHEN Zi-rong¹, LI Ya-kun¹, WANG Zhen¹, CHENG Fang-ling¹, LIU Jia-min³, ZHANG Suo-jun¹, ZHANG Bin², WAN Feng¹

¹Department of Neurosurgery, ²Department of Oncology, Tongji Hospital, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei, China

³Department of Physiology, School of Basic Medicine, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei, China

Corresponding authors: WAN Feng (Email: wanruiyan@hotmail.com);

ZHANG Bin (Email: binzhang@hust.edu.cn)

【Abstract】 Objective To investigate the expression heterogeneity of transforming growth factor- β -induced protein (TGFBI) in glioblastoma (GBM) multiform and the mechanism of its promotion on malignancy of glioma stem cells (GSCs) in vitro. **Methods** Using The Cancer Genome Atlas (TCGA), Chinese Glioma Genome Atlas (CGGA), REMBRANDT and Oncomine database to analyse the potential

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2019.12.006

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:81272423);国家自然科学基金资助项目(项目编号:81471283)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院神经外科(朱洪涛、陈籽荣、厉亚坤、王震、程芳玲、张所军、万锋),肿瘤科(刘佳敏);430030 武汉,华中科技大学同济医学院基础医学院(刘丹,张斌)

通讯作者:万锋,Email:wanruiyan@hotmail.com;张斌,Email:binzhang@hust.edu.cn

associations between grades, subtypes, overall survival (OS) of GBM and the expression level of TGFBI and the correlation between TGFBI and tumor-associated macrophages (TAMs) marker CD11b and CD163. Treating human monocytes cell line U937 with sequential peripheral blood mononuclear cells and IL-4 to get Primed- and M2-TAMs, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) were used to detect the expression level of markers for M1-, M2-TAMs and TGFBI. Performing immunofluorescent and immunohistochemical stain to reveal the distribution of TGFBI, M2-TAMs and GSCs in specimen of GBM patients, adding rhTGFBI to the culture medium to see its impacts on the sphere formation and invasion capacity of NCH-421K. **Results** According to the RNA-seq and microarray data of GBM patients in each database, expression level of TGFBI positively correlated to GBM grades and negatively to OS, Furthermore, expression level of TGFBI were strongly correlate with either pan TAMs marker CD11b or M2-TAMs marker CD163, and as the induction of U937-derived M2-TAMs, the expression level of M2-TAMs marker and TGFBI increased accompanied by decreasingly M1-TAMs marker. Also, we found an obvious co-location between TGFBI and CD163, SOX2 in frozen and paraffin sections of GBM specimens. Lastly, we demonstrate that rhTGFBI could enhance the sphere formation and invasion capacity of NCH-421K in vitro. **Conclusions** M2-TAMs secrete TGFBI to promote the sphere formation and invasion capacity of GSCs in GBM.

【Key words】 Glioblastoma; Macrophages; Transforming growth factor beta; Neoplastic stem cells; Tumor cells, cultured

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81272423, 81471283).

Conflicts of interest: none declared

胶质母细胞瘤是脑胶质瘤中恶性程度最高且临床十分常见的原发于中枢神经系统的恶性肿瘤,患者预后极差,平均生存期 <15 个月^[1-2]。近年提出的胶质瘤干细胞(GSCs)理论认为,与构成肿瘤主体的相对分化的肿瘤细胞不同,胶质瘤干细胞虽仅占极少数,但因其干细胞特性,是驱动肿瘤发生发展和侵袭迁移,以及放射治疗和药物化疗抵抗的根源^[3]。胶质瘤干细胞与其周围复杂但有序的肿瘤微环境(TME)之间的相互作用是使其具有“种子”细胞特性的重要原因,维持其干细胞特性的重要微环境因素包括缺氧、血管内皮细胞、肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)等^[4-6],其中TAMs是胶质瘤最主要的炎性细胞,约占肿瘤细胞的30%,其数目和浸润程度与胶质瘤分级和预后明显相关,在胶质瘤的发生发展中发挥重要作用^[6-7]。在生理条件下,TAMs具有细胞毒性和杀伤异物的M1极化表型;在胶质母细胞瘤的发生过程中,TAMs被肿瘤细胞募集和诱导,成为促进肿瘤生长的M2表型^[8],即肿瘤细胞通过释放白细胞介素-10(IL-10)、转化生长因子- β 1(TGF- β 1)和各种前列腺素等,抑制TAMs抗肿瘤的免疫反应,诱导其分泌IL-6、血管内皮生长因子(VEGF)、基质金属蛋白酶(MMPs)等,促进肿瘤细胞生长、血管形成、基质降解和侵袭^[6-8]。胶质瘤干细胞与TAMs通过相应的自分泌、旁分泌和细胞外囊泡(EVs)等形式,形成彼此促进的微环境^[5]。转化生长因子- β 诱

导蛋白(TGFBI)是TGF- β 信号转导通路上除经典SMAD通路外的诸多传导调控分子之一,被TGF- β 1诱导而分泌,在不同肿瘤中受肿瘤微环境中特异性整合素受体和细胞外基质(ECM)的相互作用,既可表现为促肿瘤作用,也可表现为抑肿瘤效应^[9],然而在胶质瘤中的作用尚不明确。本课题组通过前期对肿瘤基因组学图谱计划(TCGA)、中国脑胶质瘤基因组图谱计划(CGGA)、脑肿瘤分子数据库(REMBRANDT)、Oncomine数据库的检索发现,TGFBI与TAMs的分布存在相关性。本研究拟通过诱导M2型TAMs、体外培养并检测胶质瘤干细胞系成球能力和侵袭能力,初步探讨TGFBI在胶质瘤中的作用及可能的作用机制。

材料与方法

一、实验材料

1. 主要细胞系来源 人原代胶质瘤干细胞系NCH-421K由德国海德堡大学神经外科实验室Herold-Mende Christel教授惠赠,稳定传代后取第10~20代细胞用于实验;人外周血单核细胞系U937购自中国典型培养物保藏中心(CCTCC),经稳定传代后取第10~20代细胞用于实验。

2. 试剂与仪器 (1)药品与试剂:DME/F12培养液、DMEM培养液、RPMI-1640培养液、胎牛血清(FBS)购自美国Gibco公司,1,2-苯丙异噻唑-3-酮、

苯丙异噻唑啉酮 (BIT) 血清替代物为加拿大 Stemcells 公司产品, 重组人表皮生长因子 (EGF)、碱性纤维母细胞生长因子 (bFGF)、IL-4 由美国 Peprotech 公司提供, 重组人 TGFBI (rhTGFBI) 购自北京义翘神州公司; I 抗工作液 [包括 TGFBI 抗体 (1:100)、CD163 抗体 (1:100)、SOX2 抗体 (1:50)] 分别由英国 Abcam 公司、美国 Santa Cruz 公司和 Proteintech 公司提供, 山羊抗兔和山羊抗鼠荧光 IgG II 抗、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 IgG II 抗 (均 1:150) 为美国 Proteintech 公司产品; Matrigel 基质胶由美国 Corning 公司提供。(2) 仪器与设备: 聚合酶链反应 (PCR) 仪和实时荧光定量 PCR 检测仪均为美国 Bio-Rad 公司产品, 光学显微镜和倒置相差荧光显微镜购自日本 Olympus 公司。

二、实验方法

1. 数据库检索 分别检索 TCGA、CCGA、REMBRANDT、Oncomine 数据库, 选择胶质瘤患者 RNA-seq 或芯片数据后, 检索 TGFBI 在不同级别胶质瘤、不同亚型胶质母细胞瘤中的表达水平, 以及 TGFBI 表达变化与患者生存期之间的关系, 并分析 TCGA、CCGA 数据库中 TGFBI 表达变化与 M0 型和 M2 型 TAMs 标志物 CD11b、CD163 水平的相关性。

2. 细胞培养 先将人原代胶质瘤干细胞系 NCH-421K 置于含体积分数为 20% BIT、20 ng/ml EGF、20 ng/ml bFGF 的 DME/F12 培养液中, 37 °C、5% 二氧化碳、饱和湿度常规悬浮成球培养, 每 3 天添加一次生长因子 (EGF 和 bFGF), 后光学显微镜下测量细胞球直径达 80 ~ 150 μm 时传代。人外周血单核细胞系 U937 置于含体积分数为 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中, 37 °C、5% 二氧化碳、饱和湿度常规悬浮培养, 细胞融合率达 80% 时传代。

3. M2 型巨噬细胞样细胞的诱导 于常规培养的 U937 细胞培养基中滴加 10 ng/ml PMA, 作用 24 h 后诱导为 Primed-U937 细胞, 然后, 再向其中滴加 20 ng/ml IL-4, 作用 48 h 后分化为 M2 型巨噬细胞样细胞 (M2-MLC); 采用 Trizol 法提取 Primed-U937 细胞和 M2-MLC 细胞总 RNA, 实时定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测诱导过程中 TGFBI, M1 型 TAMs 标志物 CD80、IL-6, 以及 M2 型 TAMs 标志物 CC 趋化因子配体 18 (CCL18)、血管内皮生长因子 A (VEGFA) 等肿瘤微环境因素的表达变化。

4. 免疫荧光染色和免疫组织化学染色 经抗原修复后的胶质母细胞瘤标本依次水化、破膜、封闭

后, 滴加 I 抗 [TGFBI 抗体 (1:100)、CD163 抗体 (1:100)、SOX2 抗体 (1:50)], 4 °C 孵育过夜, 水洗后以荧光 IgG II 抗或过氧化物酶标记的 IgG II 抗避光室温孵育 1 h, 水洗后再以含 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 的防荧光淬灭剂封片或二氨基联苯胺 (DAB) 染色后中性树脂封片, 倒置相差荧光显微镜或光学显微镜观察。倒置相差荧光显微镜下胞核呈蓝色、TGFBI 呈绿色、CD163 或 SOX2 呈红色为阳性细胞, 光学显微镜下胞核呈棕色为 SOX2 阳性细胞、胞质和细胞间隙呈棕色为 TGFBI 阳性细胞。

5. 胶质瘤干细胞系成球实验 取体外培养生长良好的 NCH-421K 细胞, 计数细胞并调整细胞密度至 5×10^3 个/ml, 将细胞悬液 100 μl 加入 96 孔板中进行常规培养, 于实验组加入 rhTGFBI 至终浓度为 10 μg/ml (rhTGFBI 组)、空白对照组加入等量灭菌水 (对照组), 每 2 天补充新鲜培养基 50 μl; 于细胞接种第 7 天时光学显微镜下计数每孔成球细胞数目、测量成球直径, 并采用 ImageJ 软件 (美国国立卫生研究院) 进行数据统计。每组均设置 6 个复孔, 取平均值。

6. 胶质瘤干细胞球 Matrigel 基质胶侵袭实验 取体外培养生长良好的 NCH-421K 细胞, 于光学显微镜下吸取直径 100 μm 的均匀细胞球, 种植至 24 孔板 Matrigel 基质胶中, 置培养箱孵育 1 h, 直至 Matrigel 基质胶完全凝固, 在其上加入不同处理的培养基, 实验组加入 rhTGFBI 至终浓度为 10 μg/ml (rhTGFBI 组)、空白对照加入等量灭菌水 (对照组), 每 2 天补充新鲜培养基 200 μl; 于细胞接种第 7 天在光学显微镜下测量细胞球侵袭最远的细胞至细胞球边缘的距离, 并采用 ImageJ 软件进行数据统计。每组设置 3 个复孔, 取平均值。

三、统计分析方法

采用 Graphpad Prism 6 医学绘图统计软件进行数据处理、分析及图像绘制。呈正态分布的计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用两独立样本的 *t* 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、TGFBI 在胶质瘤中的表达特点

对 TCGA 数据库中的数据分析显示, TGFBI 表达水平与胶质瘤分级和恶性程度呈正相关, 与患者生存期呈负相关; TGFBI 表达变化与 TAMs 标志物 CD11b 和 CD163 表达水平呈正相关 (图 1)。对

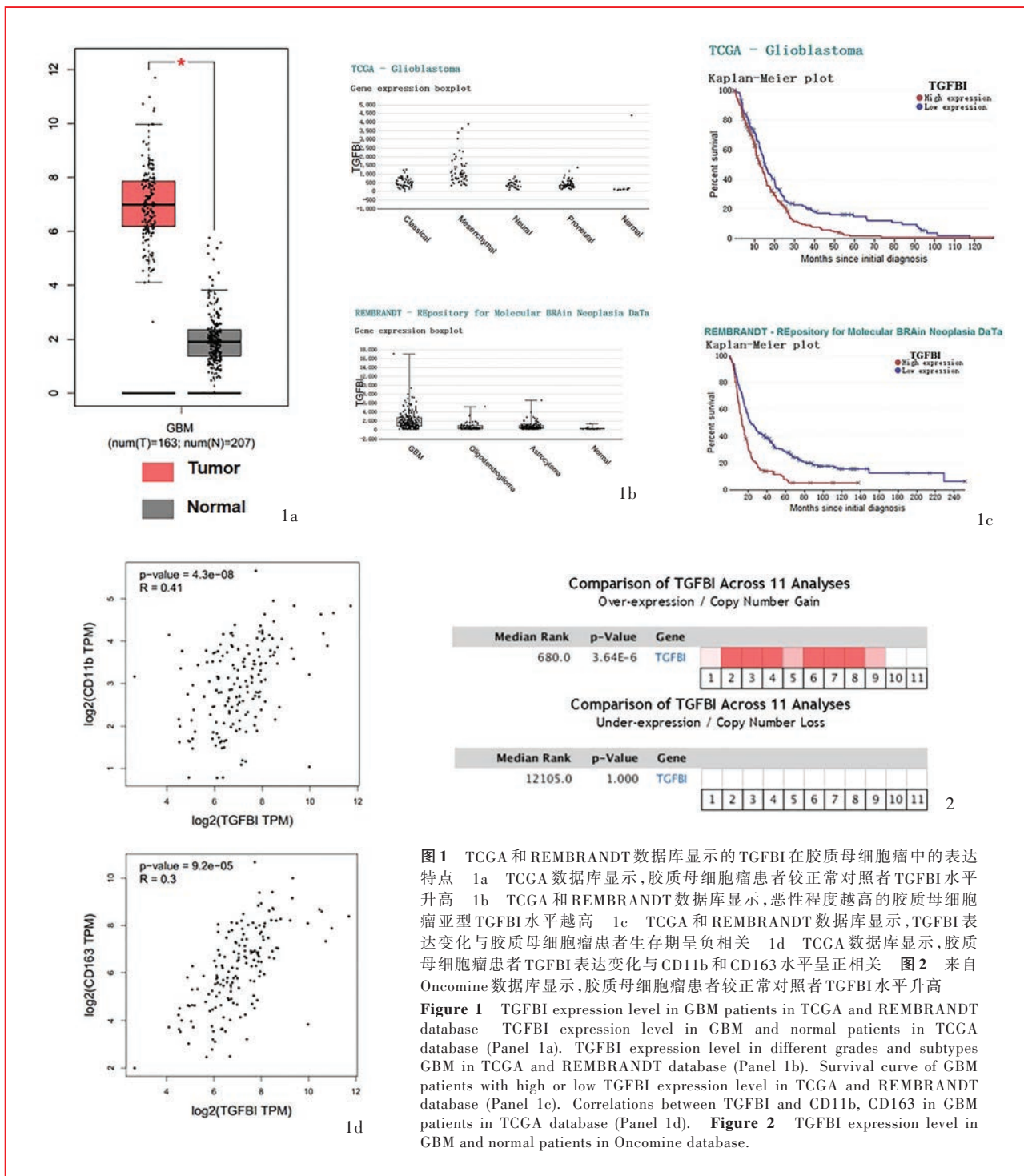


图 1 TCGA 和 REMBRANDT 数据库显示的 TGFBI 在胶质母细胞瘤中的表达特点 1a TCGA 数据库显示,胶质母细胞瘤患者较正常对照者 TGFBI 水平升高 1b TCGA 和 REMBRANDT 数据库显示,恶性程度越高的胶质母细胞瘤亚型 TGFBI 水平越高 1c TCGA 和 REMBRANDT 数据库显示,TGFBI 表达变化与胶质母细胞瘤患者生存期呈负相关 1d TCGA 数据库显示,胶质母细胞瘤患者 TGFBI 表达变化与 CD11b 和 CD163 水平呈正相关 图 2 来自 Oncomine 数据库显示,胶质母细胞瘤患者较正常对照者 TGFBI 水平升高

Figure 1 TGFBI expression level in GBM patients in TCGA and REMBRANDT database TGFBI expression level in GBM and normal patients in TCGA database (Panel 1a). TGFBI expression level in different grades and subtypes GBM in TCGA and REMBRANDT database (Panel 1b). Survival curve of GBM patients with high or low TGFBI expression level in TCGA and REMBRANDT database (Panel 1c). Correlations between TGFBI and CD11b, CD163 in GBM patients in TCGA database (Panel 1d). **Figure 2** TGFBI expression level in GBM and normal patients in Oncomine database.

CGGA、REMBRANDT、Oncomine 数据库的数据分析也得出相似结果(图 1~3)。

二、体外诱导人外周血单核细胞系向 M2 型巨噬细胞样细胞分化过程中 TGFBI 表达变化

在 U937 细胞诱导分化为 M2 型 TAMs 的过程中,qRT-PCR 法检测显示,M1 型 TAMs 标志物 CD80 ($P = 0.000$) 和 IL-6 ($P = 0.001$) 表达水平降低,M2 型

TAMs 标志物 CCL18 ($P = 0.000$) 和 VEGFA ($P = 0.002$) 表达水平升高,同时 TGFBI 表达水平亦相应升高($P = 0.001$,表 1)。

三、胶质母细胞瘤标本 TGFBI 与肿瘤相关巨噬细胞标志物和胶质瘤干细胞共定位

对 TGFBI 和 M2 型 TAMs 标志物 CD163,以及 TGFBI 和胶质瘤干细胞标志物 SOX2 的免疫荧光共

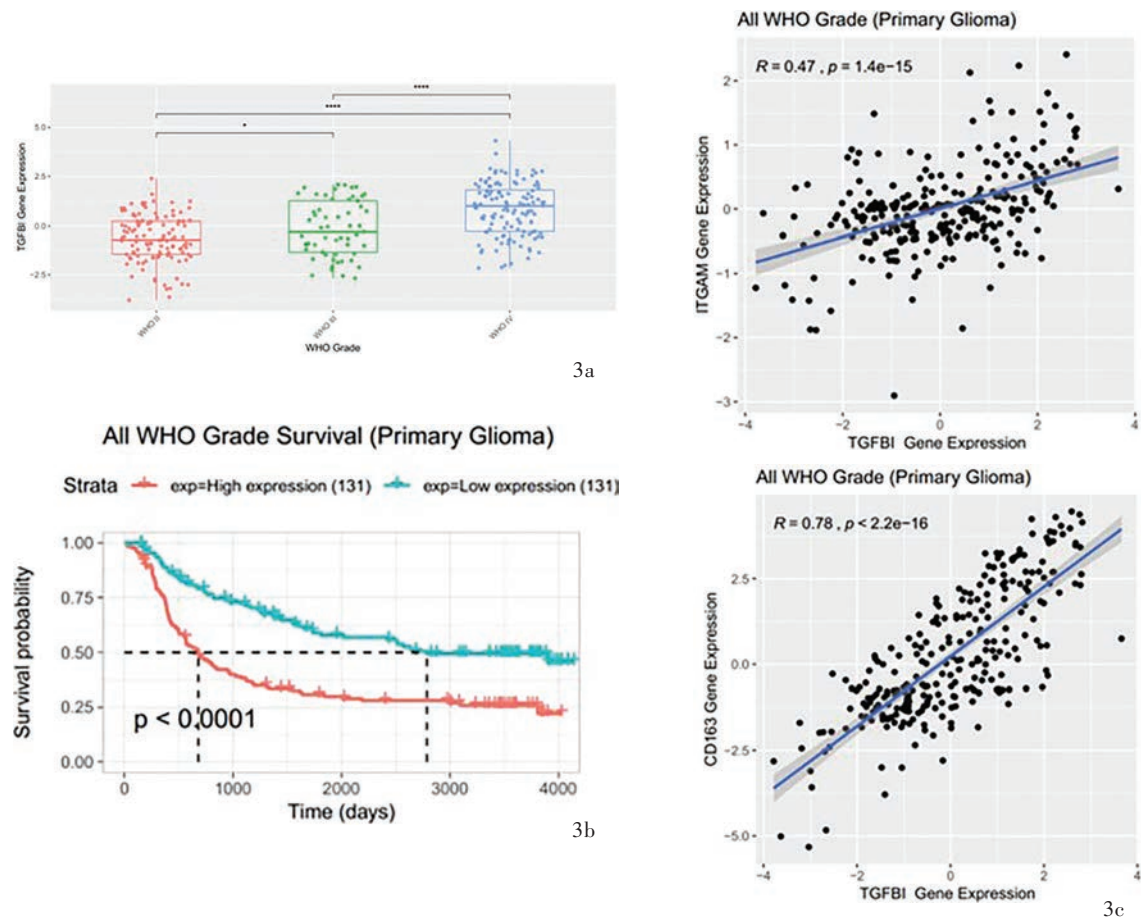


图 3 CGGA 数据库显示的 TGFBI 在胶质瘤中的表达特点 3a 不同亚型胶质母细胞瘤 TGFBI 表达水平随其恶性程度的增加而升高 3b TGFBI 表达变化与胶质母细胞瘤患者生存期呈负相关 3c 胶质母细胞瘤患者 TGFBI 表达变化与 CD11b 和 CD163 表达水平呈正相关

Figure 3 TGFBI expression level in GBM patients in CGGA database TGFBI expression level in different grades GBM in CGGA database (Panel 3a). Survival curve of GBM patients with high or low TGFBI expression level in CGGA database (Panel 3b). Correlations between TGFBI and CD11b, CD163 in GBM patients in CGGA database (Panel 3c).

表 1 Primed-U937 细胞与 U937-M2 细胞 TGFBI 及 M1 型和 M2 型 TAMs 标志物表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Comparison of expression levels of TGFBI and signatures of M1- and M2-TAMs in Primed-U937 and U937-M2 cells ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 例数 | M1 型 TAMs 标志物 | | M2 型 TAMs 标志物 | | TGFBI |
|----------------|----|---------------|-------------|---------------|-------------|-------------|
| | | CD80 | IL-6 | CCL18 | VEGFA | |
| Primed-U937 细胞 | 3 | 1.00 ± 0.09 | 1.00 ± 0.07 | 1.00 ± 0.03 | 1.00 ± 0.07 | 1.11 ± 0.41 |
| U937-M2 细胞 | 3 | 0.10 ± 0.01 | 0.43 ± 0.05 | 10.82 ± 0.98 | 5.75 ± 0.86 | 6.25 ± 0.64 |
| <i>t</i> 值 | | 13.993 | 8.663 | 11.675 | 7.309 | 8.633 |
| <i>P</i> 值 | | 0.000 | 0.001 | 0.000 | 0.002 | 0.001 |

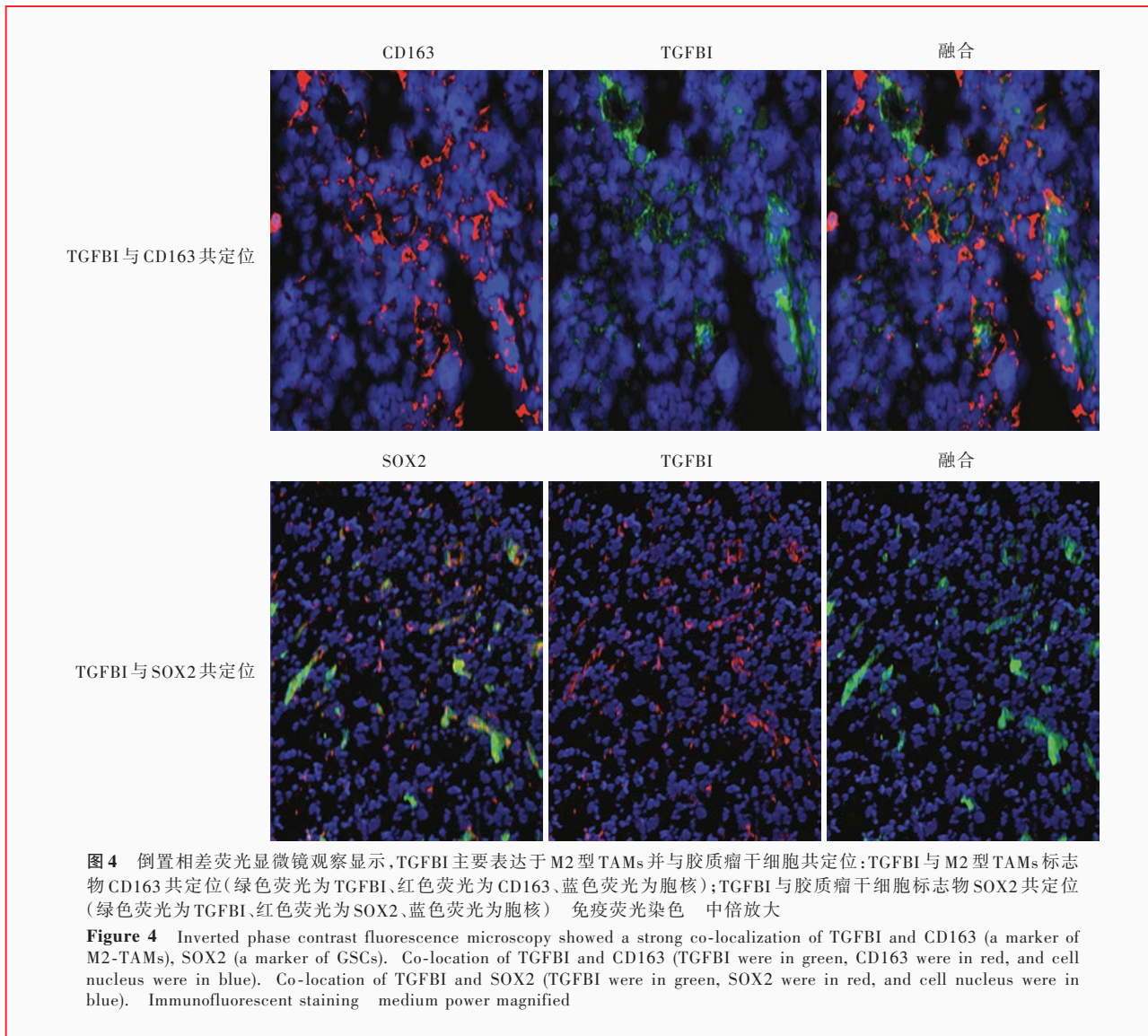
TAMs, tumor-associated macrophages, 肿瘤相关巨噬细胞; IL-6, interleukin-6, 白细胞介素-6; CCL18, chemokine (C-C motif) ligand 18, CC 趋化因子配体 18; VEGFA, vascular endothelial growth factor A, 血管内皮生长因子 A; TGFBI, transforming growth factor-β-induced protein, 转化生长因子-β诱导蛋白

染结果显示, 胶质母细胞瘤细胞中的 TGFBI 与 CD163 和 SOX2 均存在共定位(图 4); 免疫组织化学染色显示, TGFBI 仅与 SOX2 存在共定位(图 5)。表明 TGFBI 可能由 M2 型 TAMs 分泌并通过作用于胶

质瘤干细胞而发挥其促肿瘤生长作用。

四、重组人 TGFBI 显著增强 NCH-421K 细胞体外成球能力和侵袭能力

体外成球实验和侵袭实验显示, 经 rhTGFBI 处



理后, NCH-421K 细胞成球数目多于对照组 ($P = 0.000$), 细胞球侵袭能力强于对照组 ($P = 0.001$), 且差异均有统计学意义(图 6, 表 2), 表明 rhTGFBI 可以增强 NCH-421K 细胞成球、侵袭等恶性行为。

讨 论

胶质母细胞瘤是中枢神经系统发病率最高的原发性恶性肿瘤, 占成人颅内肿瘤的 40% 以上, 由于其发病率高、预后不良, 一直是基础和临床研究的热点。近年提出并为大多数学者接受的胶质瘤干细胞理论认为, 胶质瘤干细胞是实体肿瘤中的小部分具备干细胞特性的“种子”细胞^[10], 与周围包括缺氧、血管内皮细胞和 TAMs 在内的多种微环境因素相互依存, 共同促进胶质母细胞瘤的发生发展, 以及放射治疗和药物化疗抵抗等恶性行为^[11-13]。随

着肿瘤免疫治疗的兴起, 研究胶质母细胞瘤微环境内胶质瘤干细胞与周围 TAMs 的相互作用机制, 进而通过阻断其相互作用, 为改进胶质母细胞瘤治疗策略和改善患者预后提供了新的思路^[14]。

本研究重点关注的 TGFBI 是 TGF- β 信号转导通路上除经典 SMAD 通路外的诸多传导调控分子之一, 被 TGF- β 1 诱导而分泌^[15]。人体多种细胞可于 TGF- β 作用下分泌 TGFBI, 在细胞外基质中与多种成分和细胞膜表面整合素受体相互作用, 广泛参与炎症反应、粘附和迁移、组织形态发生、血管形成等病理过程^[16]。此外, TGFBI 的分泌还受 IL-4、IL-1、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等炎症因子的调控^[17], 受到肿瘤微环境中特异性整合素受体和细胞外基质的相互作用, TGFBI 在不同肿瘤中既可表现为促肿瘤作用, 也可表现为抑肿瘤效应^[18], 但在胶质瘤中

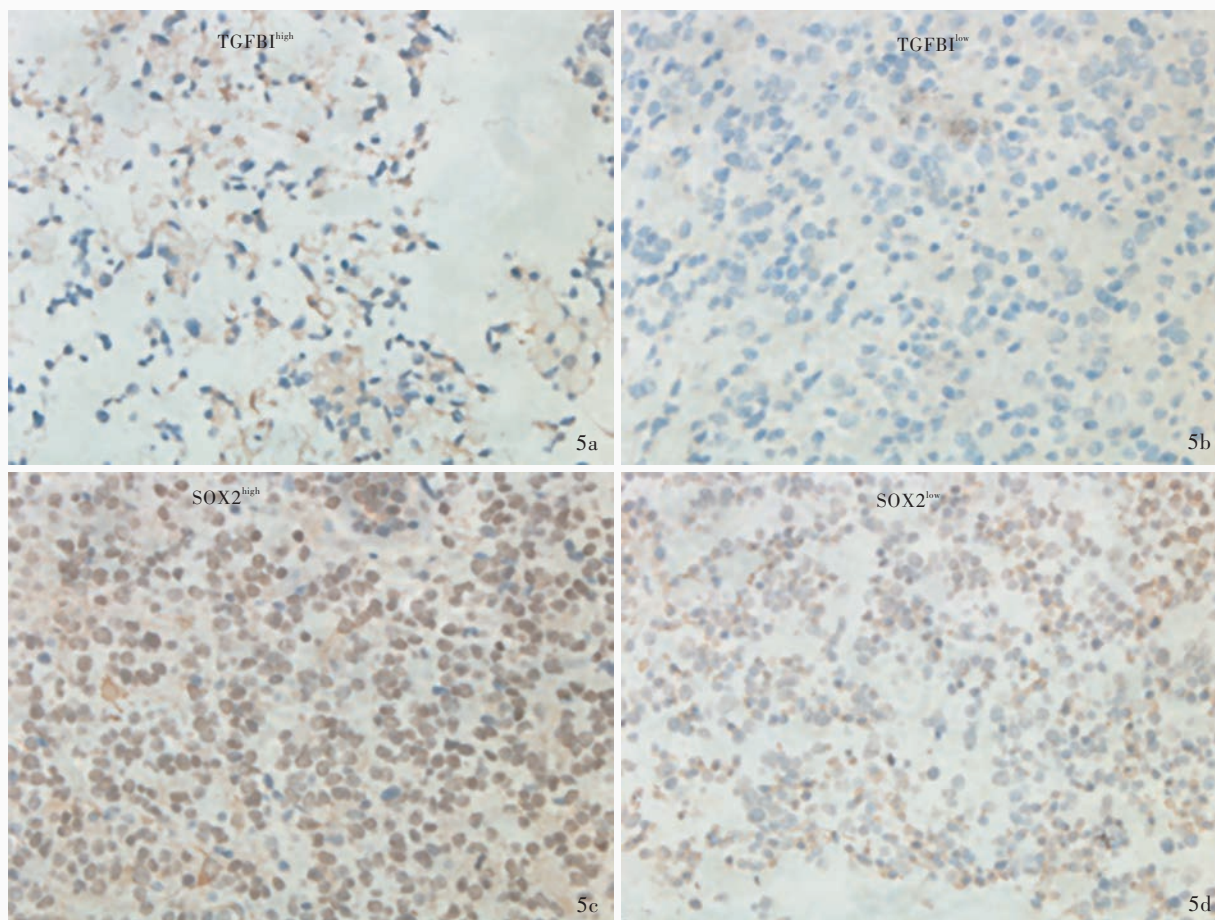


图 5 光学显微镜观察显示,TGFBI与胶质瘤干细胞共定位 免疫组织化学染色(EnVision二步法) ×200 5a,5b 胶质母细胞瘤细胞TGFBI表达阳性 5c,5d 胶质瘤干细胞标志物SOX2表达阳性

Figure 5 Optical microscopy showed a co-location of TGFBI and GSCs Immunohistochemical staining (EnVision) × 200 TGFBI was positive in tumor cells (Panel 5a, 5b). SOX2 (a GSC marker) was positive in tumor cells (Panel 5c, 5d).

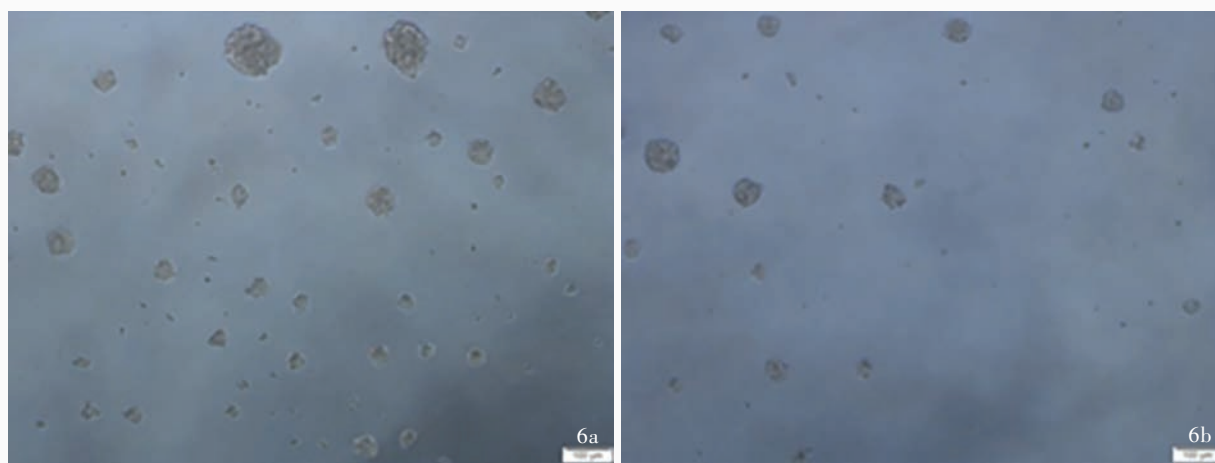


图 6 光学显微镜观察所见 ×100 6a rhTGFBI组 NCH-421K 细胞成球数目较多,细胞球直径较大 6b 对照组 NCH-421K 细胞成球数目较少,细胞球直径较小

Figure 6 Optical microscopy findings ×100 NCH-421K had more spheres whereas and large diameter in rhTGFBI group (Panel 6a). NCH-421K had less spheres whereas and small diameter in control group (Panel 6b).

的作用机制尚不十分明确,推测可能通过结合细胞表面整合素受体促进 MMP-2 和 MMP-9 的分泌,从而

参与肿瘤进展^[19]。

本研究通过检索 TCGA、CGGA、REMBRANDT、

表 2 rhTGFBI 组与对照组胶质瘤干细胞成球数目和侵袭距离的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Comparison of the tumor spheres and the invasion distance in GSCs between rhTGFBI group and control group ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 例数 | 成球数目(个/LPF) | 侵袭距离(μm) |
|------------|----|-------------------|-----------------------|
| 对照组 | 3 | 41.46 \pm 10.98 | 16.75 \pm 1.88 |
| rhTGFBI 组 | 3 | 65.26 \pm 9.01 | 46.08 \pm 13.54 |
| <i>t</i> 值 | | 7.809 | 4.402 |
| <i>P</i> 值 | | 0.000 | 0.001 |

rhTGFBI, recombinant human transforming growth factor - β - induced protein, 重组人转化生长因子- β 诱导蛋白; LPF, low power field, 低倍视野

Oncomine 数据库发现, TGFBI 表达水平与胶质瘤分级和恶性程度呈正相关, 与患者生存期呈负相关, 与 M1 型 TAMs 标志物 CD11b 和 M2 型 TAMs 标志物 CD163 表达水平呈正相关。经体外诱导的 U937 细胞可分化为 Primed-U937 细胞和 M2 型巨噬细胞样细胞, qRT-PCR 法检测显示, M1 型 TAMs 标志物 CD80 和 IL-6 表达水平降低, M2 型 TAMs 标志物 CCL18 和 VEGFA 表达水平升高, TGFBI 表达水平亦升高。免疫荧光染色和免疫组织化学染色显示, 胶质母细胞瘤细胞中的 TGFBI 与 TAMs 标志物 CD163 和胶质瘤干细胞标志物 SOX2 均存在共定位。我们采用体外培养的 NCH-421K 细胞, 观察 rhTGFBI 对细胞成球能力和侵袭能力的影响, 发现经 rhTGFBI 处理后, NCH-421K 细胞成球数目多于对照组、细胞球侵袭能力强于对照组, 结果提示 rhTGFBI 可以显著增强体外培养的胶质瘤干细胞的成球能力和侵袭能力。

本研究初步验证胶质母细胞瘤 TGFBI 主要由 M2 型 TAMs 分泌并作用于胶质瘤干细胞, 促进其干细胞特性而发挥作用。然而, 肿瘤细胞成球的大小并非恶性程度的唯一判断指标, 尚待在后续体外实验中进一步检测 TGFBI 对其他指标如细胞球形态变化等的影响; 而且, SOX2 作为胶质瘤干细胞标志物的特异性较低, 尚待在后续研究中联合其他胶质瘤干细胞分子学标志物如少突胶质细胞转录因子 2 (Olig-2) 和 CD133 进一步验证; 此外, 在后续动物实验中还需对上述体外研究结果进行验证, 同时关注 rhTGFBI 对胶质瘤干细胞系形态及其他生物学特性的影响, 并寻找 TGFBI 对胶质瘤干细胞发挥作用的上下游关键分子机制。

本研究通过对胶质瘤干细胞免疫微环境的观察, 发现 TAMs 分泌的 TGFBI 可能是调控胶质瘤干细胞表型的关键分子, 参与靶向胶质瘤干细胞与 TAMs 之间的相互作用机制, 有望成为胶质母细胞瘤治疗策略的理论依据。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial[J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10:459-466.
- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68:394-424.
- [3] Wan F, Zhang S, Xie R, Gao B, Campos B, Herold-Mende C, Lei T. The utility and limitations of neurosphere assay, CD133 immunophenotyping and side population assay in glioma stem cell research[J]. *Brain Pathol*, 2010, 20:877-889.
- [4] DeNardo DG, Ruffell B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy[J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19: 369-382.
- [5] Hambardzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression [J]. *Nat Neurosci*, 2016, 19:20-27.
- [6] Joseph JV, Conroy S, Pavlov K, Sontakke P, Tomar T, Eggens-Meijer E, Balasubramanian V, Wagemakers M, den Dunnen WF, Kruyt FA. Hypoxia enhances migration and invasion in glioblastoma by promoting a mesenchymal shift mediated by the HIF1 α -ZEB1 axis[J]. *Cancer Lett*, 2015, 359:107-116.
- [7] Zhao YD, Zhang QB, Chen H, Fei XF, Shen YT, Ji XY, Ma JW, Wang AD, Dong J, Lan Q, Huang Q. Research on human glioma stem cells in China[J]. *Neural Regen Res*, 2017, 12:1918-1926.
- [8] Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes[J]. *Trends Immunol*, 2002, 23:549-555.
- [9] Li W, Graeber MB. The molecular profile of microglia under the influence of glioma[J]. *Neuro Oncol*, 2012, 14:958-978.
- [10] Ostrom QT, Gittleman H, Truitt G, Boscia A, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in The United States in 2011-2015[J]. *Neuro Oncol*, 2018, 20:IV1-86.
- [11] Zhou XC, Hai L, Zhang C, Liu B, Li S, Lin Y, Wang W, Li T, Yang YH, Cheng C, Yu SP, Yang XJ. Effect of Notch1 pathway activation on migration and invasion of glioma stem cells[J]. *Zhonghua Shen Jing Yi Xue Za Zhi*, 2016, 15:41-46. [周星辰, 海龙, 张辰, 刘波, 李帅, 林雨, 王伟, 李涛, 杨亦寒, 程斌, 于圣平, 杨学军. Notch1 通路活化对胶质瘤干细胞迁移和侵袭能力的影响[J]. *中华神经医学杂志*, 2016, 15:41-46.]
- [12] Yu SP, Yang XJ, Zhang B, Ming HL, Liu B, Liu ZF, Ren BC,

- Chen C, Gao W. Glioma stem cells enhanced angiogenesis and its relationship with microvessel[J]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, 2012, 50:452-456.[于圣平, 杨学军, 张斌, 明浩朗, 刘彬, 刘志峰, 任炳成, 陈聪, 高伟. 胶质瘤干细胞增强血管形成及与微血管的关系[J]. *中华外科杂志*, 2012, 50:452-456.]
- [13] Ween MP, Oehler MK, Ricciardelli C. Transforming growth factor-beta-induced protein (TGFB1)(β Ig-H3): a matrix protein with dual functions in ovarian cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13:10461-10477.
- [14] Ma C, Rong Y, Radloff DR, Datto MB, Centeno B, Bao S, Cheng AW, Lin F, Jiang FS, Yeatman TJ, Wang XF. Extracellular matrix protein beta1g-H3/TGFB1 promotes metastasis of colon cancer by enhancing cell extravasation[J]. *Genes Dev*, 2008, 22:308-321.
- [15] Ye XZ, Xu SL, Xin YH, Yu SC, Ping YF, Chen L, Xiao HL, Wang B, Yi L, Wang QL, Jiang XF, Yang L, Zhang P, Qian C, Cui YH, Zhang X, Bian XW. Tumor-associated microglia/macrophages enhance the invasion of glioma stem-like cells via TGF-beta 1 signaling pathway[J]. *J Immunol*, 2012, 189:444-453.
- [16] Jackson CM, Choi J, Lim M. Mechanisms of immunotherapy resistance: lessons from glioblastoma[J]. *Nat Immunol*, 2019, 20:1100-1109.
- [17] Man J, Yu X, Huang H, Zhou W, Xiang C, Huang H, Miele L, Liu Z, Bebek G, Bao S, Yu JS. Hypoxic induction of vasorin regulates Notch1 turnover to maintain glioma stem-like cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22:104-118.
- [18] Chen P, Zhao D, Li J, Liang X, Li J, Chang A, Henry VK, Lan Z, Spring DJ, Rao G, Wang YA, DePinho RA. Symbiotic macrophage-glioma cell interactions reveal synthetic lethality in pten-null glioma[J]. *Cancer Cell*, 2019, 35:868-884.
- [19] Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CL, Rich JN. Cancer stem cells in glioblastoma[J]. *Genes Dev*, 2015, 29:1203-1217.

(收稿日期:2019-12-16)

· 小词典 ·

中英文对照名词词汇(三)

- 辣根过氧化物酶 horseradish peroxidase(HRP)
- 狼疮抗凝物 lupus anticoagulant(LA)
- 磷脂酰肌醇 3-激酶 phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)
- 颅脑创伤 traumatic brain injury(TBI)
- 颅脑创伤性凝血病
brain trauma-induced coagulopathy(BTIC)
- 氯吡格雷联合阿司匹林治疗急性轻型卒中或
短暂性脑缺血发作试验
Clopidogrel with Aspirin in Acute Minor Stroke or
Transient Ischemic Attack(CHANCE)
- 脉搏血氧饱和度 pulse oxygen saturation(SpO₂)
- 酶联免疫吸附试验
enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)
- 美国国家老龄化研究所-阿尔茨海默病学会
National Institute on Aging-Alzheimer's Association
(NIA-AA)
- 美国国家生物技术信息中心
National Center for Biotechnology Information(NCBI)
- 美国国立癌症数据库 National Cancer Data Base(NCDB)
- 美国国立卫生研究院卒中量表
National Institutes of Health Stroke Scale(NIHSS)
- 美国国立综合癌症网
National Comprehensive Cancer Network(NCCN)
- 美国食品与药品管理局
Food and Drug Administration(FDA)
- 美国肿瘤流行病学监控和预后数据库
Surveillance, Epidemiology and End Results(SEER)
- 蒙特利尔认知评价量表
Montreal Cognitive Assessment(MoCA)
- 弥漫性中线胶质瘤 diffuse midline glioma(DMG)
- 脑白质高信号 white matter hyperintensity(WMH)
- 脑深部电刺激术 deep brain stimulation(DBS)
- 脑微出血 cerebral microbleeds(CMBs)
- 脑小血管病 cerebral small vessel disease(cSVD)
- 脑肿瘤分子数据库
REpository for Molecular BRAin Neoplasia DaTa
(REMBRANDT)
- 黏弹性试验 Viscoelastic Tests(VETs)
- 凝血酶原时间 prothrombin time(PT)
- 皮质脊髓束 corticospinal tract(CST)
- ¹¹C-匹兹堡复合物 B ¹¹C-Pittsburgh compound B(¹¹C-PIB)
- KPS评分 Karnofsky Performance Status(KPS)
- 轻度认知损害 mild cognitive impairment(MCI)
- 全球胶质母细胞瘤适应性临床创新试验体系
Glioblastoma Multiforme Adaptive Global Innovative
Learning Environment(GBM AGILE)
- 全外显子组测序 whole exome sequencing(WES)
- 上皮间质转化 epithelial mesenchymal transition(EMT)
- 上皮膜抗原 epithelial membrane antigen(EMA)
- 少突胶质细胞转录因子 2
oligodendrocytes transcription factor-2(Olig-2)
- 神经原纤维缠结 neurofibrillary tangles(NFTs)
- 神经肿瘤反应评价
Response Assessment in Neuro-Oncology(RANO)
- 神经肿瘤免疫治疗反应评价
Immunotherapy Response Assessment in Neuro-Oncology
(iRANO)
- 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳
sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
(SDS-PAGE)
- 实时定量聚合酶链反应
quantitative real-time polymerase chain reaction(qRT-PCR)
- 世界卫生组织 World Health Organization(WHO)