

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.22.005

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211029.1830.026.html\(2021-11-01\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211029.1830.026.html(2021-11-01))M2 亚型巨噬细胞对胃癌细胞迁移及上皮-间质转化的影响^{*}李 伟¹, 郑 萍², 赵绍林², 周 颖², 李海宁³

(1. 江苏省连云港市第一人民医院中心实验室 222001; 2. 江苏省连云港市第一人民医院检验科 222001;

3. 南京医科大学康达学院医学检验系, 江苏连云港 222000)

[摘要] **目的** 探讨 M2 亚型巨噬细胞对胃癌细胞迁移及上皮-间质转化(EMT)的影响。**方法** 磁性活化细胞分选法(MACS 法)分离获得临床胃癌患者肿瘤组织与外周血来源巨噬细胞。采用流式细胞和 RT-qPCR 分析并评价胃癌微环境中浸润的肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)的亚型。Transwell 小室迁移实验检测胃癌组织来源巨噬细胞(GC-TAMs)对肿瘤细胞迁移能力的影响。Western blot 和 RT-qPCR 评价 GC-TAMs 对肿瘤细胞 EMT 的调节作用。**结果** GC-TAMs 中 CD204⁺ 细胞的比例明显高于癌旁组织; GC-TAMs 中 CD163、CD204、CD206、IL-10 和 CCL-22 等 M2 亚型相关基因的转录水平明显高于癌旁组织, 而 M1 亚型相关基因 IL-23(p19) 的转录水平则明显降低。胃癌患者外周血来源巨噬细胞的表面标记蛋白及亚型相关基因表达情况与 GC-TAMs 相似。体外共培养实验显示, M2 亚型 GC-TAMs 对肿瘤细胞的迁移能力具有明显促进作用, 镜下可见胃癌细胞形态发生明显间质细胞样改变, 且细胞中 EMT 相关基因和蛋白 fibronectin、vimentin 和 snail2 的表达明显上调。**结论** 胃癌微环境中浸润 TAMs 以 M2 亚型为主, 且可通过诱导肿瘤细胞发生 EMT 而对其迁移能力发挥促进作用。

[关键词] 胃肿瘤; 巨噬细胞; 亚型; 迁移; 上皮-间质转化**[中图法分类号]** R735.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2021)22-3803-07Effect of M2 subtype macrophages on migration and epithelial-mesenchymal transition of gastric cancer cells^{*}LI Wei¹, ZHENG Ping², ZHAO Shaolin², ZHOU Ying², LI Haining³

(1. Central Laboratory; 2. Department of Clinical Laboratory, Lianyungang Municipal First People's Hospital, Lianyungang, Jiangsu 222001, China; 3. Faculty of Medical Laboratory Science, Kangda College of Nanjing Medical University, Lianyungang, Jiangsu 222000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of M2 subtype macrophages on the migration and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of gastric cancer cells. **Methods** The tumor tissue and peripheral blood derived macrophages were separated and obtained from the tumor tissue or peripheral blood in the patients with clinical gastric cancer by the magnetic activated cell sorting (MACS) method. The subtype of tumor-associated macrophages (TAMs) infiltrating in gastric cancer microenvironment was analyzed and evaluated by adopting the flow cytometry and RT-qPCR. The Transwell chamber migration experiment was used to detect the effect of gastric cancer tissue-derived tumor-associated macrophages (GC-TAMs) on tumor cell migration ability. Western blot and RT-qPCR were exploited to evaluate the regulating role of GC-TAMs on the EMT of tumor cells. **Results** The proportion of CD204⁺ cells in GC-TAMs was significantly higher than that in the paracancerous tissues. The transcription levels of M2 subtype-related genes of CD163, CD204, CD206, IL-10 and CCL-22 in GC-TAMs were significantly higher than those in the paracancerous tissues, whereas the transcriptional level of M1 subtype related gene IL-23 (p19) was significantly decreased. In peripheral blood macrophages from the patients with gastric cancer, the surface marker protein and the expression of subtype-related genes were similar to those in GC-TAMs. The in vitro co-culture experiment displayed that M2 subtype GC-TAMs had the significant promoting effect on the migrating ability of tumor cells. The significant interstitial-like cell morphological change of gastric cancer cells were observed under microscope, moreover

^{*} 基金项目: 江苏省重点实验室开放课题项目(XZSYSKF2020001); 连云港市“521”人才项目(2016015668)。 作者简介: 李伟(1983—), 副主任技师, 博士, 主要从事胃癌的病理机制研究。

the expressions of EMT-related genes such as fibronectin, vimentin and snail2 were significantly up-regulated.

Conclusion Infiltrated TAMs is dominated by M2 subtype in gastric cancer microenvironment, moreover which plays the promoting role on the migrating ability by inducing the EMT occurrence of tumor cells.

[Key words] gastric cancer; macrophages; subtype; migration; epithelial-mesenchymal transition

作为最主要的致死性恶性肿瘤之一,胃癌在我国的发病率和病死率始终居高不下,已成为威胁国民健康的公共卫生事件^[1]。目前高转移率仍然是影响临床胃癌患者长期生存率的主要因素之一^[2]。因此,阐明胃癌转移相关的病理学机制将是探寻胃癌有效治疗靶点的重要途径。

肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)是肿瘤微环境中的主要免疫细胞之一。在肿瘤发生、发展的不同时期, TAMs 在经典活化(M1)与替代活化(M2)等亚型之间发生极化,分别发挥抗肿瘤与促肿瘤作用^[3]。目前,肿瘤局部浸润的 M2 亚型 TAMs 已被证实与肿瘤转移密切相关,并且提示预后不良^[4]。上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)作为重要的细胞生物学进程之一,在肿瘤转移的多个环节发挥关键作用^[5]。发生 EMT 后的上皮细胞,其表型特性向具有干性、侵袭性、耐药性及远端器官转移性的方向转化^[6],是诱导肿瘤体内转移与复发的重要病理学因素。

本研究拟采用磁性活化细胞分选法(MACS)分离获得胃癌组织及外周血来源 TAMs,并对其亚型进行鉴定。在体外共培养体系中,探讨胃癌组织来源 TAMs (gastric cancer-derived tumor-associated macrophages, GC-TAMs)对胃癌细胞迁移能力及 EMT 的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株

采用 MACS 体外分离 GC-TAMs 后,培养于含 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 RPMI1640 中。人胃癌细胞株 MKN-28 由苏州大学第一附属医院赠予,并以含 10% FBS 的 RPMI1640 营养液培养。胃癌组织来源间充质干细胞(gastric cancer-derived mesenchymal stem cells, GC-MSCs)参照早期文献报道的方法进行分离^[7],并以含 15% FBS 的 L-DMEM 营养液培养。

1.1.2 主要试剂

人肿瘤组织解离试剂盒和人 CD14 磁珠分选试剂盒均购自德国 Miltenyi 公司;RPMI1640 营养液、FBS 和胰酶购自美国 Gibco 公司;佛波酯(PMA)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;Ficoll-Hypaque(1.077 g)淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司;抗人 CD204-PE 购自美国 R&D 公司;重组人细胞因子 IL-4 (rhIL-4)购自爱必信(上海)生物科技有限公司;TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;RNA 逆

转录试剂盒购自美国 Roche Diagnostics 公司;RT-qPCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;Transwell 小室购自美国 Corning 公司;抗人 CD204-PE 抗体及 PE 同型对照购自美国 R&D 公司;抗人 E-cadherin、vimentin 和 snail2 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;抗人 fibronectin 和 β -actin 购自美国 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 GC-TAMs 分离培养

选取连云港市第一人民医院胃癌切除术患者 3 例,病理确诊为胃腺癌,且术前均未接受任何放化疗。留取患者癌组织及癌旁组织(距癌变部位 5 cm 以上,且病理检查未见癌组织),取材均获患者家属同意并签署知情同意书。以 PBS 冲洗清除新鲜癌组织表面血液后,将其剪成 1 mm³ 小块并浸泡于抗生素溶液。利用 gentleMACSTM Octo 单细胞解离器(德国 Miltenyi 公司)及人肿瘤组织解离试剂盒将肿瘤组织解离为具有活性的单细胞悬液。按照人 CD14 磁珠分选试剂盒说明书操作分离获得 GC-TAMs,同样方法分离所得癌旁组织来源巨噬细胞设为对照。

1.2.2 外周血来源巨噬细胞分离培养

采用 Ficoll-Hypaque(1.077 g)淋巴细胞分离液分离获得 3 例胃腺癌患者的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs),健康体检者外周血分离所得 PBMCs 设为对照。本研究经连云港市第一人民医院医学伦理学委员会批准,患者及其家属知情同意。随后,利用 CD14 磁珠阳性分选法从 PBMCs 中分离 CD14⁺ 细胞。流式细胞法检测分选所得细胞中 CD14⁺ 细胞比例后,将其以 5×10^5 /mL 的密度接种于 6 孔板中。50 ng/mL PMA 体外刺激 CD14⁺ 单核细胞 24 h 后,将其诱导分化获得巨噬细胞。所得巨噬细胞以 20 ng/mL rhIL-4 继续刺激培养 24 h 可诱导获得 M2 亚型(阳性对照)。

1.2.3 流式细胞检测

收集 GC-TAMs 及对应癌旁组织来源巨噬细胞或外周血来源巨噬细胞,以预冷 PBS 洗涤重悬。将所得细胞悬液与抗 CD204-PE 抗体于 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, PBS 洗涤重悬后上机检测,分析巨噬细胞免疫表型。

1.2.4 RT-qPCR 检测

收集 GC-TAMs 及对应癌旁组织来源巨噬细胞或外周血来源巨噬细胞,TRIzol 裂解收集各组巨噬细胞后抽提 RNA 以检测巨噬细胞亚型相关基因。收集 GC-TAMs 共培养处理的胃癌细胞 MKN-28 并抽提 RNA 后,检测胃癌细胞中 EMT 相关基因表达情况。

利用 NanoDrop-2000 分光光度计对总 RNA 的纯度和含量进行分析,选择吸光度 ($A_{260/280\text{ nm}}$) 为 1.8~2.0 的标本开展实验。按照 RNA 逆转录试剂盒说明书操作将 RNA 逆转录为 cDNA。巨噬细胞亚型相关基因及胃癌细胞 EMT 相关基因引物均采用 Primer Software 软件(美国 Invitrogen 公司)设计,并由上海

生工生物技术有限公司合成,见表 1、2。qPCR 反应混合体系(20 μL)中分别含有 $2 \times \text{SYBR Taq}$ (Tli Plus) 10 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 0.4 μL 、50 $\times$ ROX Reference Dye II 0.4 μL 及 cDNA 模板 2 μL , 各 qPCR 反应均重复 3 次。以 $\beta\text{-actin}$ 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 分析方法计算各基因的相对表达量。

表 1 巨噬细胞亚型相关基因扩增引物序列

基因名称	引物序列	片段长度 (bp)	退火温度 ($^{\circ}\text{C}$)
CD163	上游:5'-ACTCTGGATCTGCTGACTTC-3'	219	60
	下游:5'-CTTCCATGCTCCAGCCATTA-3'		
CD204	上游:5'-AATAGTGGCAGCTCAACTCC-3'	201	61
	下游:5'-ATGAGTTGGCTTCCATGTC-3'		
CD206	上游:5'-ATTAGGTGGAGAGGCAGTTG-3'	259	62
	下游:5'-GTGATTCGGCATCCTGGTTG-3'		
IL-10	上游:5'-GATCTCCGAGATGCCTTCAG-3'	259	61
	下游:5'-ATCGATGACAGCGCCGTAGC-3'		
IL-23(p19)	上游:5'-CCAGAGACGCGCTGAACAGA-3'	606	64
	下游:5'-TTGAAGCGGAGAAGGAGACG-3'		
CCL-22	上游:5'-GGCGCTCAAGCAACTGAGG-3'	260	65
	下游:5'-CAAGGCCACGGTCATCAGAG-3'		
$\beta\text{-actin}$	上游:5'-TGGACTTCGAGCAAGAGATG-3'	207	60
	下游:5'-GGATGTCCACGTCACACTTC-3'		

表 2 胃癌细胞 EMT 相关基因扩增引物序列

基因名称	引物序列	片段长度 (bp)	退火温度 ($^{\circ}\text{C}$)
E-cadherin	上游:5'-GCCGAGAGCTACACGTTTCAC-3'	355	60
	下游:5'-GCTTTCTGAGGCCAGGAGAG-3'		
fibronectin	上游:5'-GCGGACCTACCTAGGCAATG-3'	269	62
	下游:5'-TCCTCCAGGTGTCAACCAATC-3'		
vimentin	上游:5'-CGCCAACTACATCGACAAGG-3'	306	62
	下游:5'-GCCAGAGACGCATTGTCAAC-3'		
snail2	上游:5'-ACTACAGCGAACTGGACACA-3'	743	60
	下游:5'-ACAGCAGCCAGATTCTCAT-3'		

1.2.5 细胞培养上清液的收集

将体外分离所得 GC-TAMs 和癌旁组织来源巨噬细胞接种于 35 cm^2 培养瓶中,于 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 48 h 后分别收集细胞培养上清液(GC-TAM-CM 组、GC-Mac-CM 组)。1 200 $\times$ g 离心 10 min 去除细胞碎片后以 0.22 μm 孔径滤器过滤,分装后冻存于-140 $^{\circ}\text{C}$ 深低温冰箱备用。GC-MSC-CM 组采用同样方法收集保存以设为阳性对照,未经过细胞上清处理的为对照组。

1.2.6 Transwell 迁移实验

将胃癌细胞 MKN-28 以 4×10^4 个/孔的密度接种于 24 孔板中的 Transwell 小室上层(8.0 mm 孔

径),下室加入含 20% GC-TAM-CM 的无血清营养液。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h 后,取出 Transwell 小室,将孔膜上层未迁移的细胞刮除,下层以 4.0% 多聚甲醛和 0.5% 结晶紫固定、染色。倒置显微镜下观察并随机选取 8 个视野($\times 200$)计数迁移细胞。

1.2.7 Western blot 检测

为评价 GC-TAMs 对胃癌细胞 EMT 的影响,将 MKN-28 与 20% GC-TAM-CM 共培养 5 d 后,收集肿瘤细胞,裂解液冰上提取蛋白。取等量蛋白在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离蛋白,湿转法转至 PVDF 膜并室温封闭 1 h。加入一抗(抗人 E-cadherin、fibronectin、vimentin、snail2 和 $\beta\text{-actin}$)后,

4 ℃ 摇床孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 和兔抗鼠 IgG, 室温摇床孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 加入 ECL 试剂显色。实验结果采用全自动化学发光凝胶成像系统进行检测、分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验, 方差不齐或样本量较小采用 Mann-Whitney U 非参数检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

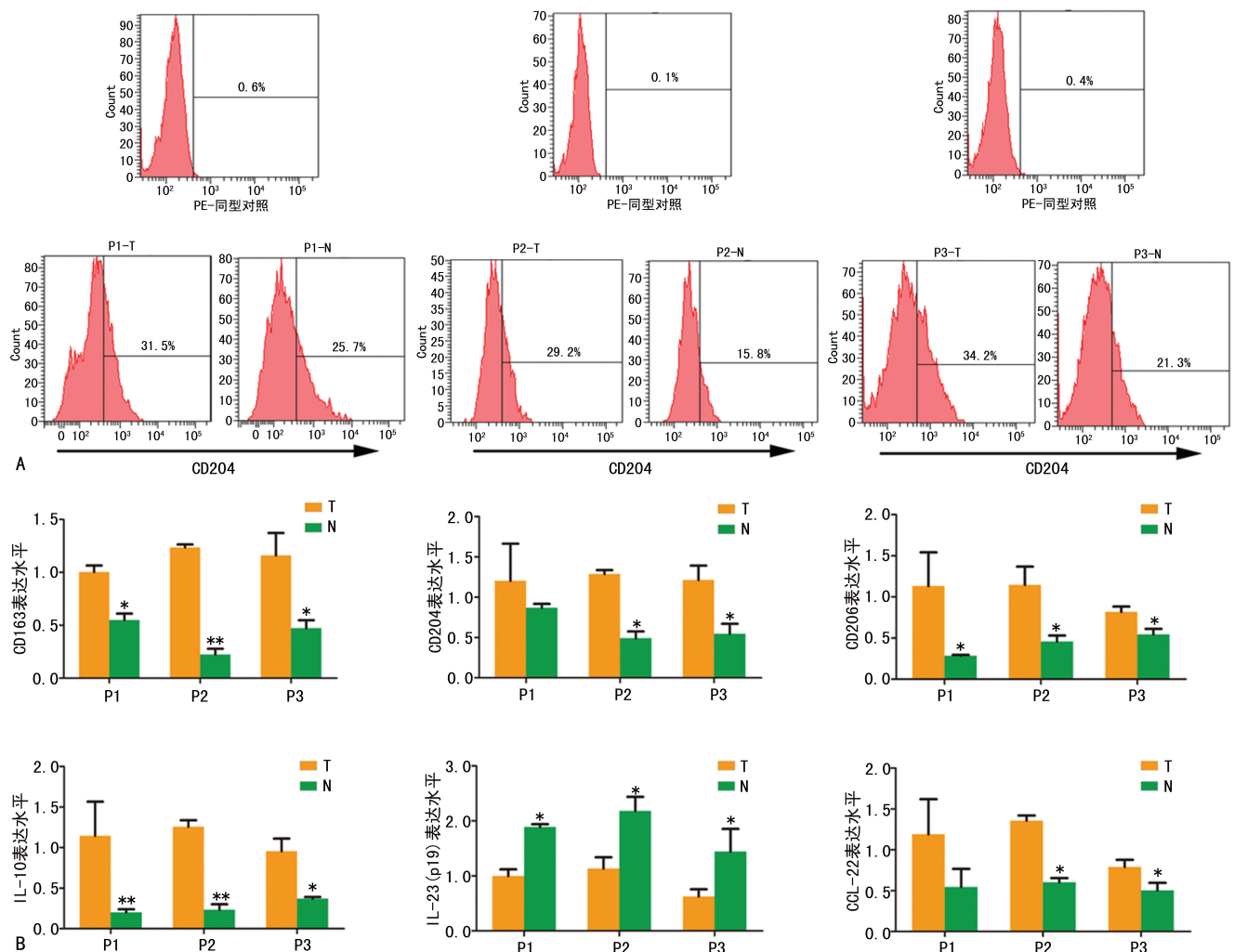
2.1 GC-TAMs 及癌旁组织来源巨噬细胞亚型鉴定

GC-TAMs 中 CD204⁺ 细胞比例明显高于癌旁组

织来源巨噬细胞, 见图 1A。与癌旁组织来源巨噬细胞比较, GC-TAMs 中 M2 亚型相关基因 CD163、CD204、CD206、IL-10 和 CCL-22 的表达水平明显升高, 而 M1 亚型相关基因 IL-23 (p19) 的表达水平明显降低, 胃癌患者 GC-TAMs 以促肿瘤作用的 M2 亚型为主, 见图 1B。

2.2 胃癌患者外周血来源巨噬细胞亚型鉴定

胃癌患者外周血来源巨噬细胞 CD204⁺ 细胞比例明显高于健康对照组, 见图 2A。与健康对照组相比, 胃癌患者外周血来源巨噬细胞中 CD163、CD204、CD206、IL-10 和 CCL-22 的表达水平明显升高, IL-23 (p19) 的表达水平明显降低, 具有被诱导分化为 M2 亚型的特性, 见图 2B。



A: 癌组织及癌旁组织巨噬细胞中 CD204⁺ 细胞比例; B: 癌组织及癌旁组织巨噬细胞中 M1/M2 亚型相关基因表达水平; P: 患者; T: 癌组织; N: 癌旁组织; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 。

图 1 癌组织及癌旁组织来源巨噬细胞亚型鉴定

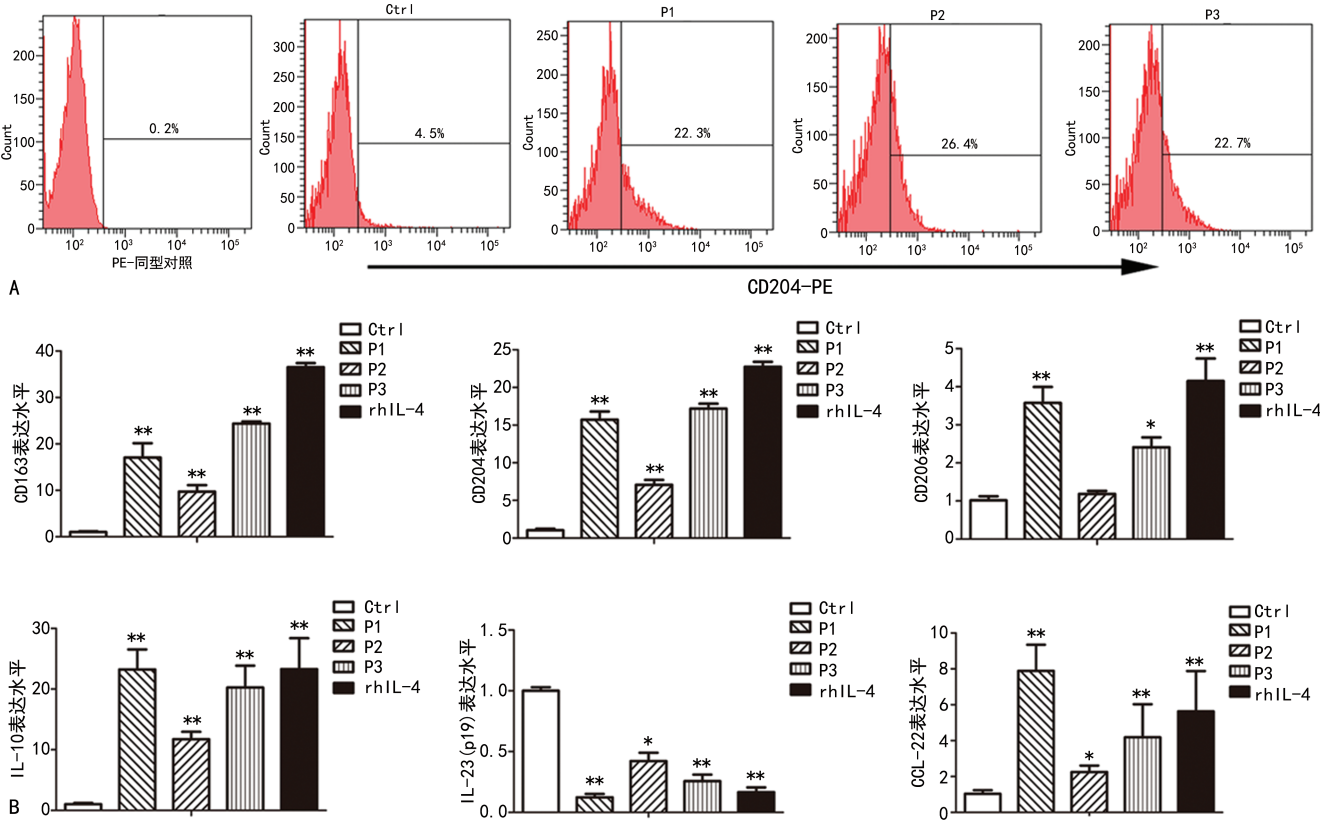
2.3 M2 亚型 GC-TAMs 对胃癌细胞迁移的影响

Transwell 迁移实验结果显示, 与癌旁组织来源巨噬细胞相比, GC-TAMs 可明显促进细胞的体外迁移, 差异有统计学意义 ($P = 0.004$)。与对照组相比, GC-MSCs 显示出较强的促胃癌细胞迁移的作用, 差异有统计学意义 ($P = 0.007$), GC-TAMs 对胃癌细胞

迁移的诱导作用与 GC-MSCs 相比更强, 差异有统计学意义 ($P = 0.009$), 见图 3。

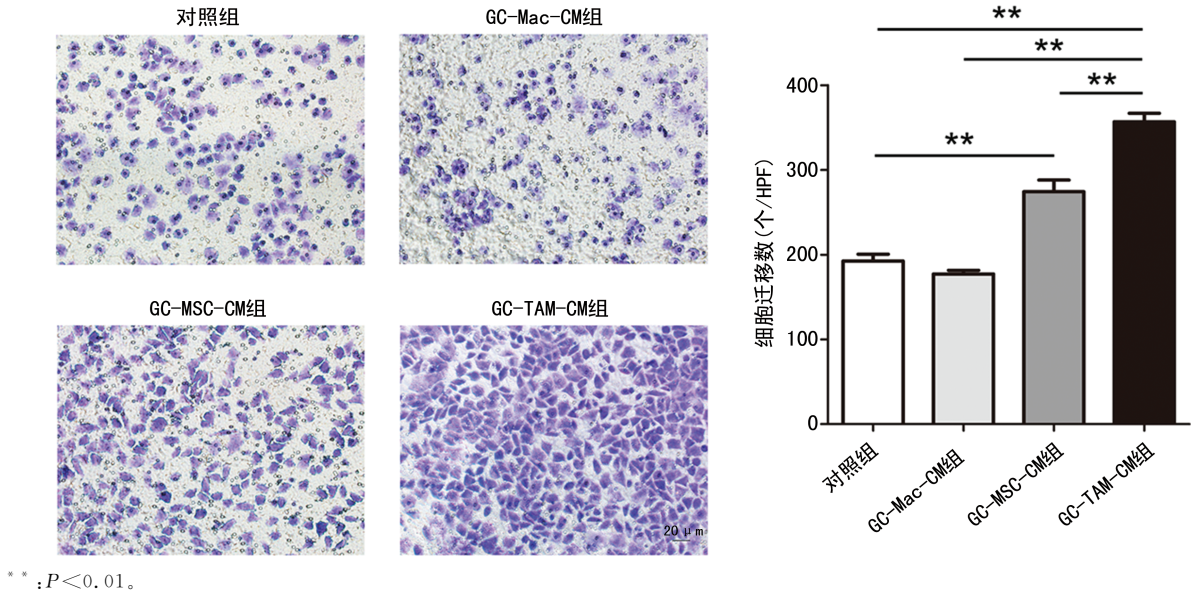
2.4 M2 亚型 GC-TAMs 对胃癌细胞 EMT 的影响

GC-TAM-CM 组细胞体伸缩拉长、细胞间分散程度增加, 其间质样细胞形态改变程度比 GC-MSC-CM 组更强, 而 GC-Mac-CM 组未发生明显改变, 见图 4。



A: 胃癌患者外周血来源巨噬细胞中 CD204⁺ 细胞比例; B: 胃癌患者外周血来源巨噬细胞中 M1/M2 亚型相关基因表达水平; Ctrl: 健康对照组; P: 患者; rhIL-4: 阳性对照; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 。

图 2 胃癌患者外周血来源巨噬细胞亚型鉴定



** : $P < 0.01$ 。

图 3 GC-TAMs 对胃癌细胞 MKN-28 迁移的影响

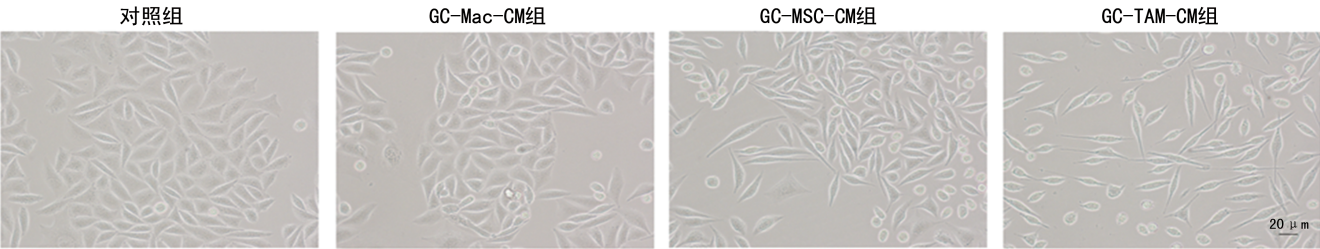


图 4 各组细胞镜下形态

2.5 GC-TAMs 对胃癌细胞 EMT 相关蛋白和基因表达的影响

Western blot 检测结果显示,与对照组比较,GC-TAM-CM 组细胞 EMT 相关蛋白 fibronectin、vimentin 和 snail2 的表达明显上调($P < 0.05$),GC-TAM-CM 组细胞 EMT 相关蛋白 fibronectin、snail2 表达明显高于 GC-MSC-CM 组($P < 0.05$),见图 5。RT-

qPCR 检测结果显示,与对照组相比,GC-TAM-CM 组细胞 EMT 相关基因 fibronectin、vimentin 和 snail2 的表达明显上调,而 E-cadherin 表达则明显下调,差异有统计学意义($P < 0.05$);GC-TAM-CM 组细胞 EMT 相关基因 fibronectin、vimentin 表达明显高于 GC-MSC-CM 组($P < 0.05$),见图 6。

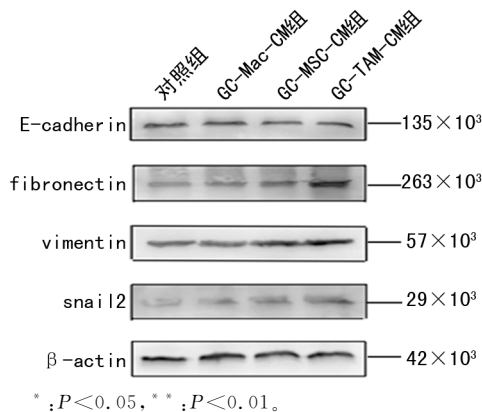


图 5 Western blot 检测各组 EMT 相关蛋白表达情况

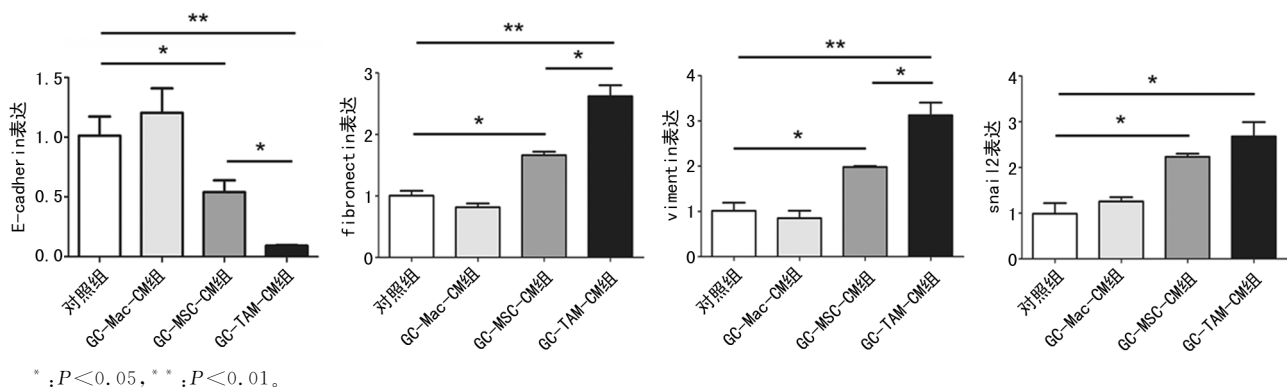
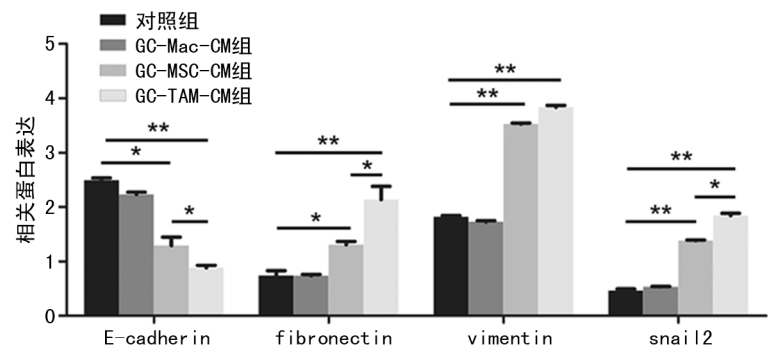


图 6 RT-qPCR 检测各组 EMT 相关基因表达情况

3 讨论

目前,转移与复发仍然是胃癌患者病死率居高不下的主要原因^[8]。研究证实,胃癌微环境中大量存在的诸如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、金属基质蛋白酶在内的分泌因子及信号通路效应分子等均具有促进肿瘤转移基质形成和肿瘤细胞远端器官转移的作用^[9]。胃癌细胞与微环境基质细胞之间的相互作用参与了胃癌转移的一系列关键步骤,包括 EMT、血管内渗、循环肿瘤细胞迁移和次级器官转移等^[10],其有望成为临床胃癌转移患者靶向治疗的重要靶点。

作为肿瘤微环境中浸润数量最多的炎症细胞, TAMs 在肿瘤基质重塑、血管生成和化疗抵抗等肿瘤病理学进展的多个环节均有重要作用^[11]。通过大量分泌细胞因子、趋化因子等, TAMs 为肿瘤生长及转移“创造”免疫抑制微环境,是调节胃癌转移的重要微环境基质细胞之一^[12]。

本研究发现,GC-TAMs 中 CD204⁺ 细胞比例明显高于癌旁组织来源巨噬细胞。同时,GC-TAMs 中 CD163、CD204 和 CD206 等 M2 亚型相关基因的表达水平也明显高于癌旁组织来源巨噬细胞。提示胃癌微环境中浸润的 TAMs 以具有促肿瘤作用的 M2 亚型为主。同时,胃癌患者外周血来源巨噬细胞的亚型特性与健康对照组也存在明显差异,胃癌患者外周血单核细胞更“倾向于”极化为 M2 亚型巨噬细胞。

有研究指出,肺癌细胞可诱导巨噬细胞极化为 M2 亚型,而其又对肺癌细胞的侵袭、迁移及 EMT 发挥促进作用^[13]。另有研究者在神经母细胞瘤中证实, TAMs 对肿瘤细胞增殖能力并无影响,但可通过 CXCL2/CXCR2 信号通路明显促进肿瘤细胞侵袭^[14]。本研究发现, M2 亚型 GC-TAMs 可促进胃癌细胞迁移,该促进作用比早期文献报道的 GC-MSCs 更强。提示胃癌微环境中浸润的 M2 亚型巨噬细胞可能在胃癌转移中发挥重要作用。

作为肿瘤转移的显著特征之一,EMT 往往伴随一系列细胞与分子生物学改变,包括:细胞-细胞间黏附性降低、细胞形态发生梭样改变及间质样蛋白的表达上调^[15]。本研究观察到胃癌细胞在 GC-TAMs 的处理下发生了细胞形态学改变。与对照组相比,GC-TAM-CM 组胃癌细胞的形态更加细长,细胞间更加散在分布,且该间质样形态改变与 GC-MSC-CM 组相比更为明显。有研究报道,M2 亚型 TAMs 可部分通过 TLR-4/IL-10 信号通路促进胰腺癌细胞 EMT^[16]。另一篇基于卵巢癌的报道指出,肿瘤组织中大量浸润的 TAMs 可通过表达 EMT 驱动因子 ZEB1 而发挥其促肿瘤及化疗抵抗作用^[17]。此外,胃癌组织中 TAMs 的大量浸润提示患者预后不良,且可通过 TGF- β 信号通路参与诱导肿瘤 EMT^[18]。本研究显示,GC-TAMs 可明显上调胃癌细胞中间质样基因 vimentin、fibronectin 和 snail2 的表达水平。由此证实,胃癌组织中浸润的 M2 亚型 TAMs 可有效促进胃癌细胞发生 EMT。

此外,本研究还存在着一定的局限性,如纳入研究的胃癌患者病例数较少,且 GC-TAMs 促进胃癌转移的相关研究尚缺乏动物体内实验,这都值得进一步深入研究。

肿瘤微环境细胞通过细胞间相互作用及分泌细胞因子、趋化因子等形式作用于肿瘤细胞,从而对肿瘤发生、发展及耐药等发挥重要调节作用^[19-20]。本研究证实,胃癌微环境中浸润着大量 M2 亚型 TAMs,该细胞通过诱导胃癌细胞发生 EMT 而对胃癌转移发挥促进作用。

参考文献

- [1] WANG F H, SHEN L, LI J, et al. The Chinese society of clinical oncology (CSCO): clinical guidelines for the diagnosis and treatment of gastric cancer[J]. Cancer Commun (Lond), 2019, 39(1):10.
- [2] BANDO E, MAKUUCHI R, IRINO T, et al. Validation of the prognostic impact of the new tumor-node-metastasis clinical staging in patients with gastric cancer[J]. Gastric Cancer, 2019, 22(1):123-129.
- [3] LAVIRON M, BOISSONNAS A. Ontogeny of tumor-associated macrophages[J]. Front Immunol, 2019, 10:1799.
- [4] YAO Z T, ZHANG J Q, ZHANG B, et al. Imatinib prevents lung cancer metastasis by inhibiting M2-like polarization of macrophages[J]. Pharmacol Res, 2018, 133:121-131.
- [5] MITTAL V. Epithelial mesenchymal transition in tumor metastasis[J]. Annu Rev Pathol, 2018, 13:395-412.
- [6] ZHANG Y, WEINBERG R A. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities[J]. Front Med, 2018, 12(4):361-373.
- [7] LI W, ZHOU Y, YANG J, et al. Gastric cancer-derived mesenchymal stem cells prompt gastric cancer progression through secretion of interleukin-8[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2015, 34(1):52.
- [8] TAN Z. Recent advances in the surgical treatment of advanced gastric cancer: a review[J]. Med Sci Monit, 2019, 25:3537-3541.
- [9] YE T, YANG M, HUANG D, et al. MicroRNA-7 as a potential therapeutic target for aberrant NF-kappaB-driven distant metastasis of gastric cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38(1):55.
- [10] LI W, ZHANG X, WU F L, et al. Gastric cancer-derived mesenchymal stromal cells trigger M2 macrophage polarization that promotes metastasis and EMT in gastric cancer[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(12):918.
- [11] CHOI J, GYAMFI J, JANG H, et al. The role of tumor-associated macrophage in breast cancer biology[J]. Histol Histopathol, 2018, 33(2):133-145.
- [12] CHANMEE T, ONTONG P, KONNO K, et al. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment[J]. Cancers (Basel), 2014, 6(3):1670-1690.
- [13] GUO Z, SONG J, HAO J, et al. M2 macrophages promote NSCLC metastasis by upregulating CRYAB[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(6):377.
- [14] HASHIMOTO O, YOSHIDA M, KOMA Y, et al. Collaboration of cancer-associated fibroblasts and tumor-associated macrophages for neuroblastoma development[J]. J Pathol, 2016, 240(2):211-223.
- [15] PASTUSHENKO I, BLANPAIN C. EMT transition states during tumor progression and metastasis[J]. Trends Cell Biol, 2019, 29(3):212-226.
- [16] LIU C Y, XU J Y, SHI X Y, et al. M2-polarized tumor-associated macrophages promoted epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, partially through TLR4/IL-10 signaling pathway[J]. Lab Invest, 2013, 93(7):844-854.

(下转第 3815 页)

- effect of glycyrrhizin, a direct HMGB1 inhibitor, on focal cerebral ischemia/reperfusion-induced inflammation, oxidative stress, and apoptosis in rats[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e89450.
- [3] 黄震华. 新型降脂药物阿托伐他汀[J]. 中国新药与临床杂志, 2000, 19(1): 54-56.
- [4] 马航, 何海艳, 邱海艳, 等. 阿托伐他汀对慢性阻塞性肺疾病合并肺动脉高压患者的临床作用及其机制[J]. 山西医科大学学报, 2014, 45(3): 204-208.
- [5] 宋小红, 李承旭, 吴扬, 等. 阿托伐他汀对急性肾损伤大鼠的肾保护作用及炎症因子表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(16): 3929-3931.
- [6] 王婧, 赵帅, 王建欣. 缺血性脑卒中患者 SLC01B1 和 ApoE 基因多态性对阿托伐他汀疗效和安全性的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(16): 1749-1754.
- [7] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [8] 姜鑫. 辛伐他汀对全脑缺血/再灌注损伤大鼠血脑屏障的保护作用[J/CD]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2018, 5: 5-6.
- [9] SARIA A, LUNDBERG J M. Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues[J]. *J Neurosci Meth*, 1983, 8(1): 41-49.
- [10] 贺涓涓, 洪华, 杨世亮. 阿托伐他汀对脑缺血再灌注大鼠血脑屏障的保护作用[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(2): 219-223.
- [11] 李玉竹, 邹梅, 于周. 不同剂量阿托伐他汀对急性脑缺血/再灌注损伤大鼠血管内皮功能的影响及其与自噬相关信号通路 Ca^{2+} /AMPK/mTOR 的关系研究[J]. 实用心脑血管病杂志, 2019, 27(5): 50-56.
- [12] HILGENDORFF A, MUTH H, PARVIZ B, et al. Statins differ in their ability to block NF-kappaB activation in human blood monocytes[J]. *Int J Clin Pharm Ther*, 2003, 41(9): 397-401.
- [13] 鞠宁. 普伐他汀对心肌缺血/再灌注血清 TNF- α 、IL-6 的影响[D]. 青岛: 青岛大学, 2006.
- [14] LIU Y C, ZOU X B, CHAI Y F, et al. Macrophage polarization in inflammatory diseases[J]. *Int J Biol Sci*, 2014, 10(5): 520-529.
- [15] KANAZAWA M, NINOMIYA I, HATAKEYAMA M, et al. Microglia and monocytes/macrophages polarization reveal novel therapeutic mechanism against stroke[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10): 2135.
- [16] 张瑞, 沈承武, 闫根全. 川芎嗪对大鼠心肌细胞氧糖剥夺/复氧损伤的保护作用及机制研究[J]. 中国生化药物杂志, 2017, 37(9): 10-13.
- [17] 邢宏义. 脑缺血后神经可塑性与修复的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2006.
- [18] SCHNEIDER A, WEIER M, HERDERSCHEE J, et al. IRF5 is a key regulator of macrophage response to lipopolysaccharide in newborns[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1597.
- [19] 谷祥任, 张雁. 不同浓度的普伐他汀对小鼠巨噬细胞极性的影响研究[J]. 重庆医学, 2016, 45(9): 1173-1178.

(收稿日期: 2021-03-25 修回日期: 2021-09-08)

(上接第 3809 页)

- [17] CORTÉS M, SANCHEZ-MORAL L, DE BARRIOS O, et al. Tumor-associated macrophages (TAMs) depend on ZEB1 for their cancer-promoting roles[J]. *EMBO J*, 2017, 36(22): 3336-3355.
- [18] YAN Y, ZHANG J, LI J H, et al. High tumor-associated macrophages infiltration is associated with poor prognosis and may contribute to the phenomenon of epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 3975-3983.
- [19] LEE S S, CHEAH Y K. The interplay between microRNAs and cellular components of tumour microenvironment (TME) on non-small-cell lung cancer (NSCLC) progression[J]. *J Immunol Res*, 2019, 2019: 3046379.
- [20] DEEPAK K G K, VEMPATI R, NAGARAJU G P, et al. Tumor microenvironment: challenges and opportunities in targeting metastasis of triple negative breast cancer[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 153: 104683.

(收稿日期: 2021-02-18 修回日期: 2021-07-08)