

肺腺癌细胞对 RAW264.7 巨噬细胞分化的影响

宋羽霄, 唐家琢, 张志敏, 张平锋, 宋启斌, 章必成
(武汉大学人民医院肿瘤中心, 湖北 武汉 430061)

摘要: [目的] 体外探究 Lewis 肺腺癌(Lewis lung carcinoma, LLC)细胞培养上清液对小鼠 RAW264.7 巨噬细胞极化的影响及其可能机制。[方法] RAW264.7 细胞按如下分组: 空白对照组、IL-4 处理组、LLC 细胞培养上清液条件培养基(LLC-CM)培养组和 TC-1 细胞培养上清液条件培养基(TC-1-CM)培养组。各组培养 48h 后收集上清液和细胞, 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测空白对照组、IL-4 组、LLC-CM 组和 TC-1-CM 组巨噬细胞及 LLC 细胞和 TC-1 细胞培养上清液中补体 C1q 的含量, 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测巨噬细胞 CD68、CD80、CD206、Arg-1、IL-10 和 IL-27 mRNA, Western blot 检测 CD68、CD80、CD206、Arg-1、JAK2、p-JAK2、STAT5 和 p-STAT5 的表达。[结果] 巨噬细胞经 IL-4 处理后, 上清液中补体 C1q 含量较空白对照组升高 ($P < 0.001$); 与空白对照组及 IL-4 处理组相比, LLC-CM 组巨噬细胞培养上清液中补体 C1q 含量明显升高 ($P < 0.001$)。与空白对照组相比, LLC-CM 组巨噬细胞 CD80 表达明显降低 ($P < 0.001$), CD206、Arg-1、IL-10 和 IL-27 表达明显升高 ($P < 0.001$), p-JAK2、p-STAT5 ($P < 0.001$) 含量降低。此外, LLC-CM 组巨噬细胞 p-JAK2、p-STAT5 表达量低于 IL-4 处理组 ($P < 0.001$)。[结论] LLC 细胞培养上清液可以通过抑制 RAW264.7 细胞 JAK2/STAT5 通路诱导其发生 M2 型极化并促进补体 C1q 高表达, 高水平补体 C1q 可能参与促进 RAW264.7 细胞的 M2 型极化。
关键词: 肺腺癌; RAW264.7; 巨噬细胞; M2 极化; 补体 C1q
中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2022)06-0452-07
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2022.06.B003

Effect of Lung Adenocarcinoma Cells on the Polarization of Mouse Macrophage RAW264.7 Cells

SONG Yu-xiao, TANG Jia-zhuo, ZHANG Zhi-min, ZHANG Ping-feng, SONG Qi-bin, ZHANG Bi-cheng
(Cancer Center, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430061, China)

Abstract: [Objective] To explore the effect of Lewis lung adenocarcinoma(LLC) cells on the polarization of the mouse macrophages in vitro and its mechanism. [Methods] Mouse macrophage RAW264.7 cells were cultured with conditioned medium(control group) and the cultured cells were treated with IL-4(IL-4 group), LLC cells culture supernatant(LLC-CM group) or TC-1 cells culture supernatant group(TC-1-CM group), respectively. The content of complement C1q in the culture supernatant of 4 groups were detected with ELISA; the expression of CD68, CD80, CD206, Arg-1, IL-10, IL-27 mRNA was detected with real-time fluorescence quantitative RT-PCR(qRT-PCR); and the expression of CD68, CD80, CD206, Arg-1, JAK2, p-JAK2, STAT5 and p-STAT5 proteins were detected by Western blot. [Results] After RAW264.7 cells were treated with IL-4, the content of complement C1q in the supernatant was higher than that in the blank control group ($P < 0.001$). Compared with the blank control group and the IL-4 group, the content of complement C1q in LLC-CM group was significantly increased ($P < 0.001$). Compared with the blank control group, the expressions of CD80 in LLC-CM group were significantly decreased ($P < 0.001$), while the expressions of CD206, Arg-1, IL-10 and IL-27 were significantly increased (all $P < 0.001$), and the levels of p-JAK2 and p-STAT5 were reduced (both $P < 0.001$). Compared with the IL4 group, the levels of p-JAK2 and p-STAT5 in the LLC-CM group were decreased(both $P < 0.001$). [Conclusion] LLC cell culture supernatant can induce M2 polarization in RAW264.7 cells by inhibiting the JAK2/STAT5 pathway and promoting the expression of complement C1q.

Subject words: lung adenocarcinoma; RAW264.7; macrophages; M2 polarization; complement C1q

肺癌是全世界范围内最常见的恶性肿瘤,其发病率和死亡率分别占全世界癌症的 11.6%和 18.4%^[1]。

基金项目: 希思科-BMS 肿瘤免疫治疗研究基金(Y-BMS2019-003);
湖北省卫健委-武大人民联合科研课题
通信作者: 章必成, E-mail: bichengzhang@hotmail.com
收稿日期: 2021-12-05; **修回日期:** 2022-02-28

非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 占有肺癌病例的 80%~85%^[2], 是肺癌患者的主要死因, 其中肺腺癌是发病率最高的病理类型^[3], 而且具有最强的异质性和侵袭性, 患者总生存期不足 5 年^[4]。研究表明, 肿瘤微环境 (tumor microenviron-

ment, TME) 中的巨噬细胞在 NSCLC 的进展中起关键作用^[5]。巨噬细胞受到机体免疫系统的调控, 可以极化为促进炎症反应的 M1 型和抑制免疫细胞激活的 M2 型^[6]。包括本课题组在内的多项研究显示, 肺腺癌中浸润的巨噬细胞主要为 M2 型, 并且可以作为判断不良预后的生物标志物^[7-8]。巨噬细胞激活或受抑的各种调控机制已在许多炎症模型中被阐明, 但在 TME 中巨噬细胞是由哪些物质或分子经何种机制调控、与炎症反应有何差异等重要问题仍有待进一步研究。为此, 本研究在体外实验探究 Lewis 肺腺癌 (Lewis lung carcinoma, LLC) 细胞培养上清液对小鼠 RAW264.7 巨噬细胞极化的影响及其可能机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

小鼠 RAW264.7 巨噬细胞由武汉大学人民医院肿瘤中心实验室赠予, LLC 细胞由武汉大学中南医院肿瘤科赠予, 正常小鼠肺上皮细胞 TC-1 购买自上海赛百慷生物技术股份有限公司。DMEM、FBS 和青-链霉素 (美国 Gibco 公司), 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH=7.4, 美国 HyClone 公司), 小鼠 C1q ELISA 试剂盒 (武汉科鹿生物科技有限公司, 编号: ELK5208), 重组小鼠 IL-4 活性蛋白 (英国 Abcam 公司, 编号: ab259406), TRIzol 试剂 (美国 Invitrogen 公司, 编号: 15596026), 第一链 cDNA 合成试剂盒 (美国 Thermo Scientific 公司, 编号: K1612), PowerTrack™SYBR Green Master Mix 试剂盒 (美国 Applied Biosystems 公司, 编号: A46109), RIPA 裂解和提取缓冲液 (美国 Thermo Scientific 公司, 编号: 89901), BCA 蛋白定量试剂盒 (美国 Thermo Scientific 公司, 编号: 23225), 抗 CD68、CD80、CD206 和 Arg-1 抗体 (美国 CST 公司, 编号: 97778、54521、24595、43933), 抗 JAK2、p-JAK2、STAT5 和 p-STAT5 抗体 (美国 CST 公司, 编号: 3230、3776、94205、4322), 抗 β-Actin 抗体和辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG 二抗 (美国 CST 公司, 编号: 8457、7074), ECL 化学发光底物试剂盒 (美国 Invitrogen 公司, 编号: WP20005)。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养

RAW264.7 细胞、LLC 细胞和 TC-1 细胞均使用含 10% (vol/vol) FBS 和 1% (vol/vol) 青-链霉素的 DMEM

高糖培养基, 在 37 °C、5% CO₂ 的恒温箱中培养。

1.2.2 LLC 细胞及 TC-1 细胞培养上清液制备

将 LLC 细胞和 TC-1 细胞分别以 7×10⁵ 个/孔接种于 6 孔板, 待细胞生长至 70%~80% 融合时, 收集上清液并以 4 °C、400 g 离心 5 min, 取上清以 0.22 μm 过滤去除细胞碎片后分装、冻存于 -80 °C 冰箱。

1.2.3 实验分组及处理

将 RAW264.7 细胞以 4×10⁵ 个/孔接种于 6 孔板, 按下述进行分组与处理, 在恒温箱中孵育 48 h 后消化、收集细胞。空白对照组 (control 组): 使用正常完全培养基培养细胞, 每 24 h 换液; IL-4 处理组 (IL-4 组): 使用含 20 ng/mL IL-4 的完全培养基培养细胞, 每 24 h 更换一次含 IL-4 的培养基; LLC 细胞培养上清液条件培养基 (conditioned medium, LLC-CM) 培养组: 使用含 50% (vol/vol) LLC 细胞培养上清液的完全培养基进行细胞培养, 每 8 h 更换一次 LLC-CM; TC-1 细胞培养上清液条件培养基 (TC-1-CM) 培养组: 为阴性对照组, 使用含 50% (vol/vol) TC-1 细胞培养上清液的完全培养基进行细胞培养, 每 8 h 更换一次 TC-1-CM。

1.2.4 酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)

空白对照组、IL-4 组、LLC-CM 组及 TC-1-CM 组 RAW264.7 细胞在恒温箱中培养 48 h 后收集上清液, 4 °C、2 000 g 离心 10 min, 去不溶物、取上清以 0.22 μm 过滤。按照 ELISA 试剂盒说明书进行实验, 检测空白对照组、IL-4 组、LLC-CM 组、TC-1-CM 组巨噬细胞及 LLC 细胞、TC-1 细胞培养上清液中补体 C1q 的含量。

1.2.5 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)

TRIzol 法提取总 RNA, 使用微量分光光度计测定浓度。按照第一链 cDNA 合成试剂盒说明书操作进行逆转录, cDNA 产物使用 PowerTrack™SYBR Green Master Mix 试剂盒按照说明书进行实时 PCR, 检测 CD68、CD80、CD206、Arg-1、IL-10、IL-27 的表达, 以 β-actin 为内参, 结果采用 2^{-ΔΔCt} 法计算。文中列出用于 qRT-PCR 实验的引物序列 (Table 1)。2^{-ΔΔCt} 法计算公式如下:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\beta\text{-actin}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{实验组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}}$$

$$\text{相对扩增倍数} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Table 1 qRT-PCR primers

Index	Primers (5'-3')
β -actin	
Forward primer	-CTGAGAGGGAAATCGTGCGT-
Reverse primer	-CCACAGGATTCCATACCCAAGA-
CD68	
Forward primer	-CCCTGTGTGTCTGATCTTGCTAG-
Reverse primer	-GCTGGTGTGAACTGTGACATTTTC-
CD80	
Forward primer	-CCCCAGAAGACCCTCCTGAT-
Reverse primer	-CCCGAAGGTAAGGCTGTTGTT-
CD206	
Forward primer	-CGTTTTCGGTGGACTGTGGA-
Reverse primer	-GTTGTGGGCTCTGCTGGG-
Arg-1	
Forward primer	-ACACGGCAGTGGCTTTAACC-
Reverse primer	-GGCGTTTGCTTAGTCTGTCTG-
IL-10	
Forward primer	-TACAGCCGGGAAGACAATAACT-
Reverse primer	-AGGAGTCGGTTAGCAGTATGTTG-
IL-27	
Forward primer	-CTAACACCTAGCTTCAAGCCCTAT-
Reverse primer	-TAAGGACTGGAGGGCTTTTAAATT-

1.2.6 蛋白质印迹(Western blot)

使用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解细胞,在冰上提取总蛋白,以 4℃、12 000 r/min 离心 25 min,收集上清,使用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白含量。分别采用 8% (CD68、CD206、JAK2、p-JAK2、STAT5 和 p-STAT5) 和 10% (β -Actin、CD80 和 Arg-1) 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离总蛋白,湿转法将分离的蛋白印迹到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上,5%脱脂牛奶室温下封闭 PVDF 膜 2 h,除去封闭液,加入 CD68、CD80、CD206、Arg-1、JAK2、p-JAK2、STAT5 和 p-STAT5 一抗(稀释比例均为 1:1 000) 4℃过夜, TBST 洗膜 3 次后用 TBS 洗膜 1 次,每次 5 min,然后加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗(1:3 000)在室温下孵育 1 h,用 TBST 洗 4 次,每次 5 min。使用 ECL 化学发光法曝光、显影,以 β -actin 为内参,AlphaEaseFC 软件定量分析蛋白条带灰度值。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析,计量资料显示为 $\bar{x} \pm s$,采用独立样本 *t* 检验、one-way ANOVA 方差分析和 Bonferroni 事后多重比较分析组间差异,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同处理对 RAW264.7 细胞培养上清液中补体 C1q 含量的影响

空白对照组、IL-4 处理组、LLC-CM 组、TC-1-CM 组巨噬细胞、LLC 细胞及 TC-1 细胞培养上清液中补体 C1q 的含量分别为(0.725±0.048) ng/mL、(2.551±0.239) ng/mL、(3.796±0.266) ng/mL、(1.135±0.071) ng/mL、(1.602±0.091) ng/mL 及(1.035±0.069) ng/mL。与空白对照组巨噬细胞相比,LLC 细胞培养上清液中补体 C1q 的含量较高(*t*=6.367,*P*<0.01),而 TC-1 细胞培养上清液中补体 C1q 的含量与空白对照组巨噬细胞没有显著性差异;巨噬细胞经 IL-4 处理后,上清液中补体 C1q 含量较空白对照组明显升高 (*t*=13.26,*P*<0.001);与空白对照组及 IL-4 处理组相比,LLC-CM 组巨噬细胞培养上清液中补体 C1q 含量明显升高(*t*=22.30、9.04,*P* 均<0.001);与空白对照组相比,TC-1-CM 组巨噬细胞培养上清液中补体 C1q 含量的差异无统计学意义(Figure 1)。

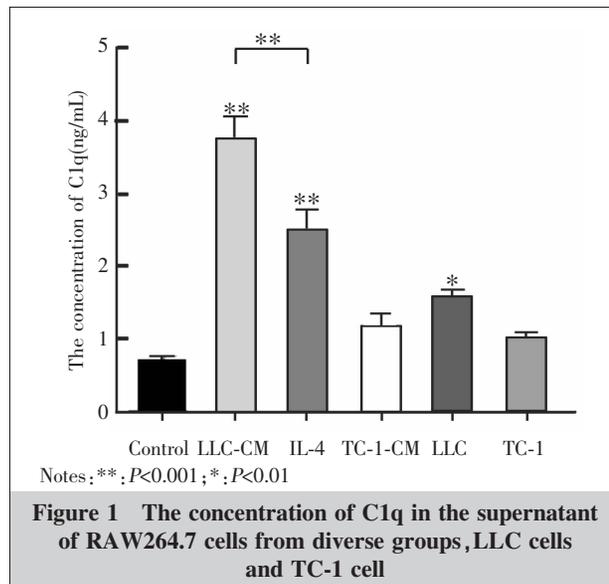


Figure 1 The concentration of C1q in the supernatant of RAW264.7 cells from diverse groups, LLC cells and TC-1 cell

2.2 LLC 细胞培养上清液诱导 RAW264.7 细胞 M2 型极化

在 mRNA 水平上,空白对照组、LLC-CM 组及 TC-1-CM 组巨噬细胞 CD68 表达无明显差异(Figure 2),LLC-CM 组巨噬细胞 M1 型表面标记受体 CD80 表达较空白对照组显著降低 (*t*=11.87,*P*<0.001),而 TC-1-CM 组 CD80 表达与空白对照组无明显差异(Figure 3)。与空白对照组相比,LLC-CM 组巨噬细胞

胞 M2 型表面标记受体 CD206 表达明显升高 ($t=8.86, P<0.001$), LLC-CM 组升高程度低于 IL-4 处理组 ($t=9.02, P<0.001$), TC-1-CM 组 CD206 表达与空白对照组无明显差异 (Figure 4)。进一步检测 LLC-CM 组巨噬细胞其他 M2 型极化标志物 mRNA, 与空白对照组相比, Arg-1、IL-10、IL-27 表达均明显增加 ($t=10.39、34.23、69.55, P$ 均 <0.001) (Figure 5)。IL-4 诱导 M2 型巨噬细胞成功, 且 LLC-CM 诱导巨噬细胞发生 M2 型极化。

在蛋白水平上检测空白对照组、LLC-CM 组及 TC-1-CM 组巨噬细胞 CD68、CD80、CD206 及 Arg-1 的表达情况, 结果显示 LLC-CM 组 CD80 表达明显低于空白对照组 ($t=19.46, P<0.001$), 而 CD206 和 Arg-1 表达相比于空白对照组显著升高 ($t=24.01、29.58, P$ 均 <0.001)。3 组巨噬细胞 CD68 表达无明显差异, 空白对照组与 TC-1-CM 组巨噬细胞 CD80、CD206 及 Arg-1 表达无明显差异 (Figure 6)。

2.3 JAK2/STAT5 通路参与 LLC 细胞培养上清液诱导 RAW264.7 细胞 M2 型极化

空白对照组、LLC-CM 组及 IL-4 处理组巨噬细胞 JAK2 ($t=3.00、1.59、1.41, P$ 均 >0.05) 和 STAT5 ($t=0.75、0.97、0.22, P$ 均 >0.05) 表达量无显著差异。与空白对照组相比, IL-4 处理组 p-JAK2、p-STAT5 ($t=2.28、1.29, P$ 均 >0.05) 水平无统计学差异, 而 LLC-CM 组 p-JAK2、p-STAT5 ($t=34.88、29.88, P$ 均 <0.001) 含量较空白对照组明显降低, 表明 LLC-CM 组巨噬细胞 JAK2/STAT5 磷酸化水平受到抑制。与 IL4 处理组相比, LLC-CM 组巨噬细胞 p-JAK2、p-STAT5 ($t=32.60、28.59, P$ 均 <0.001) 含量有明显差异 (Figure 7)。

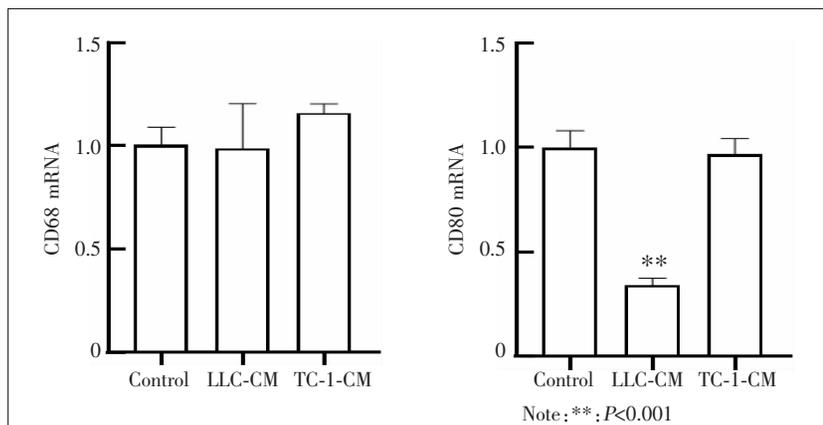


Figure 2 Effects of LLC-CM and TC-1-CM on CD68 mRNA levels in RAW264.7 cells

Figure 3 Effects of LLC-CM and TC-1-CM on CD80 mRNA levels in RAW264.7 cells

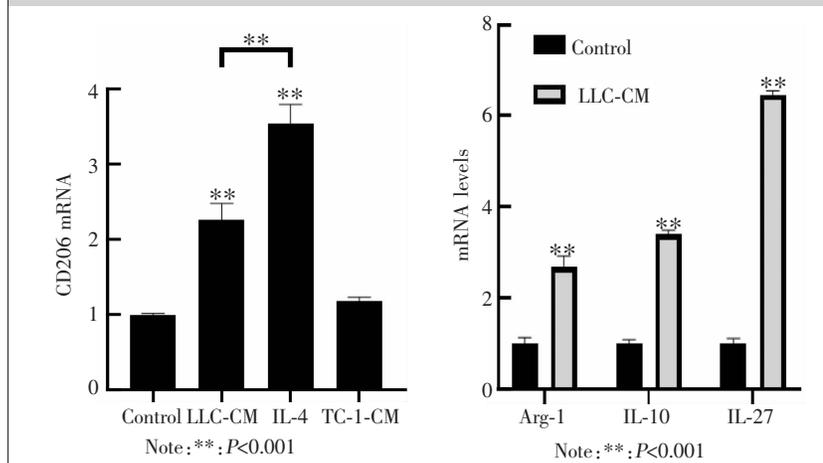


Figure 4 Effects of LLC-CM, TC-1-CM and IL-4 on CD206 mRNA levels in RAW264.7 cells

Figure 5 Effects of LLC-CM on the mRNA levels of M2 polarization markers in RAW264.7 cells

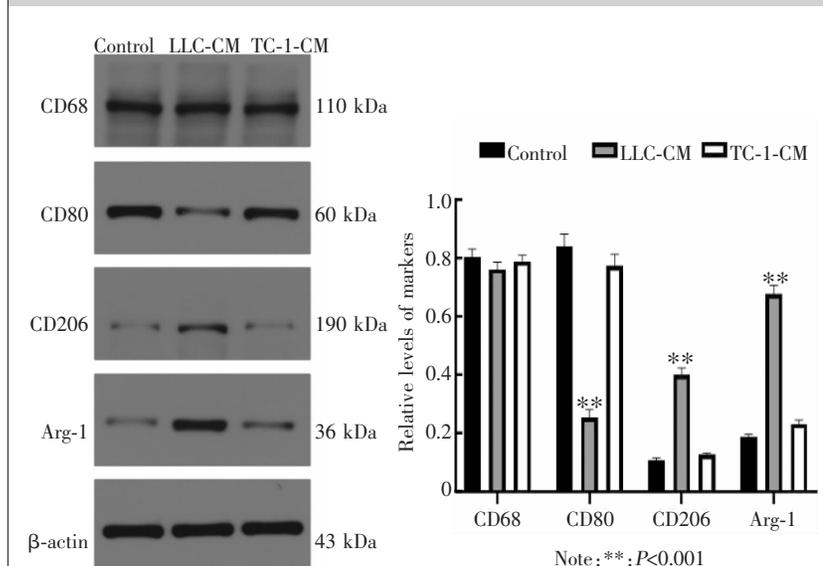


Figure 6 Effects of LLC-CM and TC-1-CM on markers of RAW264.7 cells

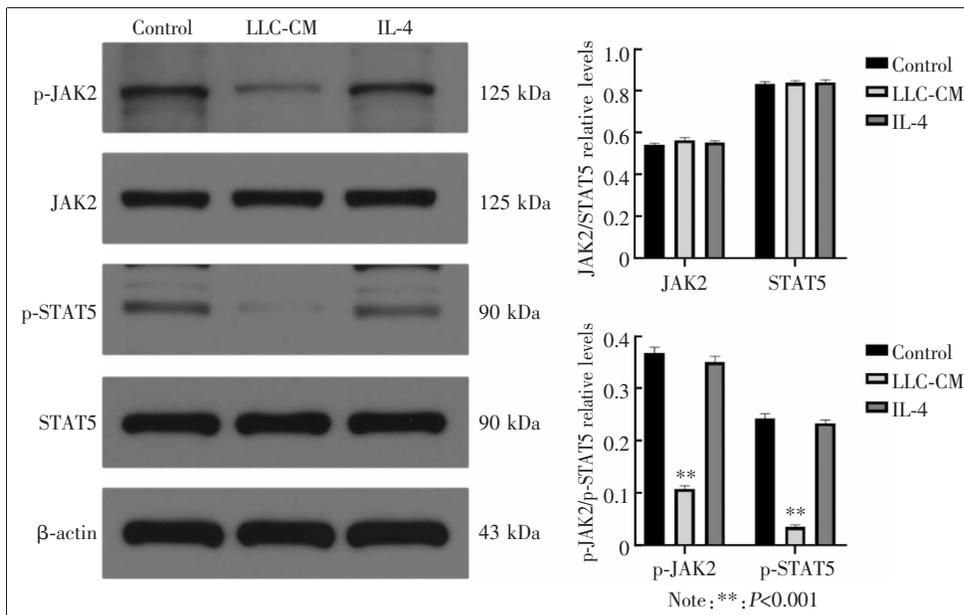


Figure 7 Effects of LLC-CM on phospho-JAK2/phospho-STAT5 in RAW264.7 cells

3 讨论

巨噬细胞的免疫功能具有很高的可塑性，一般情况下，M1型巨噬细胞的特征是高表达一氧化氮合酶、主要组织相容性复合体、CD16/32等促炎分子和IL-6、IL-12、TNF-α等促炎细胞因子，以增强免疫反应，而M2型巨噬细胞的特征是高表达CD206、CD163、Arg-1等分子和抵抗素样分子α、IL-10等细胞因子，以调节免疫反应、促进炎症消退^[5]。肿瘤相关巨噬细胞（tumor-associated macrophages, TAMs）是TME中含量最丰富的细胞群，在NSCLC的进展中起关键作用^[6-8]。TAMs存在两种状态，分别是抑制血管生成和激活抗肿瘤免疫的M1型TAMs，以及促进肿瘤生长、侵袭和转移的M2型TAMs。肺腺癌中的高M2型TAMs浸润与患者的不良预后及较差的生存期密切相关^[9-10]。本研究采用Cheah等^[11]的方法制备LLC细胞培养上清液及LLC-CM，并诱导RAW264.7细胞成为TAMs。对本研究中的TAMs使用qRT-PCR和Western blot检测极化标记分子，结果证实在细胞水平上LLC细胞培养上清液能诱导巨噬细胞的M2型极化，并使其上调炎症抑制性细胞因子的表达，使巨噬细胞发挥免疫抑制的功能。

补体系统是先天免疫系统的重要组成部分，通过溶解细胞、参与抗原识别、调节免疫细胞功能和促

进炎症反应等机制启动抵抗外源性病原体的抗感染作用^[12]。补体蛋白主要在肝脏合成，但也可以由各种细胞产生，包括巨噬细胞、成纤维细胞、内皮细胞、部分肿瘤细胞和基质细胞等^[13-14]。补体与肿瘤之间的相互作用具有多重性。一方面，作为可溶性分子，补体可以更迅速、更容易地进入肿瘤组织，通过形成过敏毒素、调理素以及裂解肿瘤细胞等途径发挥募集免疫细胞、促进炎症介质的释放^[15]及参与诱导CD4+

T细胞向辅助型T细胞1(Th1)分化^[16]等作用，实现直接抑制肿瘤细胞增殖^[17]并增强抗肿瘤免疫反应；另一方面，肿瘤细胞产生的补体可以促进自身增殖和迁移，并通过募集调节性T细胞、刺激各种血管生成因子释放和直接调节TAMs等机制维持TME的免疫抑制性和促进肿瘤远处转移^[18-19]。因此，补体与肿瘤的相互作用缺乏一般规律可循，不同癌种应视具体情况而论。有研究表明，抑制补体途径能减缓小鼠肺腺癌移植瘤生长、减少TAMs和髓源抑制细胞的百分比，表现出抗肿瘤免疫活性，而TME中补体系统的激活则与肿瘤的快速进展和远处转移密切相关^[20-23]，在人类肺腺癌中也发现C1q等补体的高表达预示着不良预后^[24]。本研究证实巨噬细胞和LLC细胞均有表达补体C1q的能力，未受任何刺激正常状态下的巨噬细胞仅分泌极少量补体C1q，而LLC细胞培养上清液中含有相对较多的C1q。IL-4处理巨噬细胞使其极化为M2型，标记分子明显升高的同时上清液中C1q的含量也增加，表明巨噬细胞的M2型极化伴随着C1q表达的增强。进一步研究发现仅使用LLC细胞培养上清液刺激而不使用IL-4也能使巨噬细胞发生M2型极化，并且C1q的表达能力进一步增强，明显高于IL-4处理的巨噬细胞。表明LLC细胞培养上清液诱导巨噬细胞的M2型极化的过程中伴随大量补体C1q的表达。有研究证实

C1q 与巨噬细胞结合可以调节其表现为抗炎表型^[25], 这表明本研究中 LLC 细胞培养上清液中的补体 C1q 可以诱导巨噬细胞发生 M2 型极化。根据实验结果, LLC-CM 组巨噬细胞上清液中 C1q 的含量显著高于空白对照组与 LLC 细胞培养上清液中 C1q 的含量, 可以推测, 由 LLC 细胞培养上清液诱导的 M2 型巨噬细胞进一步过表达 C1q, 并以 C1q 依赖的方式促进自身 M2 型极化加强。与体内真实的 TME 不同, 体外 LLC-CM 培养体系缺乏 IL-4 等免疫抑制性细胞因子, 因此单纯使用 LLC 细胞培养上清液诱导的巨噬细胞 M2 型极化程度低于用 IL-4 诱导的巨噬细胞。

JAK/STAT 是机体内一种高度保守的信号通路, 在机体的免疫调节和炎症过程中具有重要作用^[26]。JAK/STAT 蛋白有多种亚型, 巨噬细胞活化为促炎表型常常与 JAK1/2、STAT1/3 等的磷酸化有关^[27]。本研究发现 LLC 细胞培养上清液诱导的 M2 型巨噬细胞 JAK2/STAT5 磷酸化受到抑制, 而 IL-4 诱导的 M2 型巨噬细胞 JAK2/STAT5 通路基本未受影响。研究结果说明 LLC 细胞培养上清液可以通过抑制 JAK2/STAT5 通路磷酸化的途径诱导巨噬细胞发生 M2 型极化。

综上所述, LLC 细胞培养上清液可以通过抑制 RAW264.7 细胞 JAK2/STAT5 通路磷酸化诱导 RAW264.7 细胞发生 M2 型极化。此过程可能与 LLC 细胞培养上清液诱导的 M2 型 TAMs 过表达 C1q 有关, TAMs 以过表达 C1q 并依赖 C1q 的方式促进自身 M2 型极化。

本研究也存在不足。本研究采用 LLC 细胞系与 RAW264.7 巨噬细胞进行体外实验, 与真实肺腺癌细胞及 TME 存在差异。此外, 本研究发现 LLC 细胞培养上清液诱导的 M2 型巨噬细胞中补体 C1q 的表达大幅升高, 其分子机制及补体 C1q 对 TAMs 的具体调控作用有待后续深入研究。

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] Alexa T, Antoniu SA, Alexa I, et al. Checkpoint inhibitors in NSCLC for the elderly: current challenges and per-

spectives[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2021, 21(3): 315-323.

[3] Zhang H, Guo L, Chen J. Rationale for lung adenocarcinoma prevention and drug development based on molecular biology during carcinogenesis [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13:3085-3091.

[4] Denisenko TV, Budkevich IN, Zhivotovsky B. Cell death-based treatment of lung adenocarcinoma [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2):117.

[5] Zhang N, Liu C, Jin L, et al. Ketogenic diet elicits antitumor properties through inducing oxidative stress, inhibiting MMP-9 expression, and rebalancing M1/M2 tumor-associated macrophage phenotype in a mouse model of colon cancer[J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(40):11182-11196.

[6] Wang N, Wang S, Wang X, et al. Research trends in pharmacological modulation of tumor-associated macrophages[J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(1):e288.

[7] Zheng X, Weigert A, Reu S, et al. Spatial density and distribution of tumor-associated macrophages predict survival in non-small cell lung carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2020, 80(20):4414-4425.

[8] Zhang B, Yao G, Zhang Y, et al. M2-polarized tumor-associated macrophages are associated with poor prognoses resulting from accelerated lymphangiogenesis in lung adenocarcinoma[J]. *Clinics(Sao Paulo)*, 2011, 66(11):1879-1886.

[9] Yang M, McKay D, Pollard JW, et al. Diverse functions of macrophages in different tumor microenvironments [J]. *Cancer Res*, 2018, 78:5492-5503.

[10] Hwang I, Kim JW, Ylaya K, et al. Tumor-associated macrophage, angiogenesis and lymphangiogenesis markers predict prognosis of non-small cell lung cancer patients[J]. *J Transl Med*, 2020, 18(1):443.

[11] Cheah MT, Chen JY, Sahoo D, et al. CD14-expressing cancer cells establish the inflammatory and proliferative tumor microenvironment in bladder cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(15):4725-4730.

[12] Bareke H, Akbuga J. Complement system's role in cancer and its therapeutic potential in ovarian cancer[J]. *Scand J Immunol*, 2018, 88(1):e12672.

[13] Afshar-Kharghan V. The role of the complement system in cancer[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(3):780-789.

[14] Reis ES, Mastellos DC, Ricklin D, et al. Complement in cancer: untangling an intricate relationship [J]. *Nat Rev Immunol*, 2018, 18(1):5-18.

[15] Rogers LM, Veeramani S, Weiner GJ. Complement in monoclonal antibody therapy of cancer [J]. *Immunol Res*, 2014, 59:203-210.

- [16] Gunn L, Ding C, Liu M, et al. Opposing roles for complement component C5a in tumor progression and the tumor microenvironment[J]. J Immunol, 2012, 189: 2985–2994.
- [17] Peerschke EIB, Ghebrehiwet B. cC1qR/CR and gC1qR/p33: observations in cancer [J]. Mol Immunol, 2014, 61: 100–109.
- [18] Roumenina LT, Daugan MV, Petitprez F, et al. Context-dependent roles of complement in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2019, 19(12): 698–715.
- [19] Zha H, Wang X, Zhu Y, et al. Intracellular activation of complement c3 leads to pd-11 antibody treatment resistance by modulating tumor-associated macrophages [J]. Cancer Immunol Res, 2019, 7(2): 193–207.
- [20] Kwak JW, Laskowski J, Li HY, et al. Complement activation via a C3a receptor pathway alters CD4(+) T lymphocytes and mediates lung cancer progression[J]. Cancer Res, 2018, 78: 143–156.
- [21] Vadrevu SK, Chintala NK, Sharma SK, et al. Complement c5a receptor facilitates cancer metastasis by altering T-cell responses in the metastatic niche[J]. Cancer Res, 2014, 74: 3454–3465.
- [22] Sharma SK, Chintala NK, Vadrevu SK, et al. Pulmonary alveolar macrophages contribute to the premetastatic niche by suppressing antitumor T cell responses in the lungs[J]. J Immunol, 2015, 194: 5529–5538.
- [23] Kleczko EK, Kwak JW, Schenk EL, et al. Targeting the complement pathway as a therapeutic strategy in lung cancer[J]. Front Immunol, 2019, 10: 954.
- [24] Ajona D, Pajares MJ, Freire J, et al. Prognostic value of complement system in nsclc and its association with PD-1 and PD-L1 expression[J]. J Thorac Oncol, 2018, 13(10): S394.
- [25] Espericueta V, Manughian-Peter AO, Bally I, et al. Recombinant C1q variants modulate macrophage responses but do not activate the classical complement pathway[J]. Mol Immunol, 2020, 117: 65–72.
- [26] Hashimoto R, Kakigi R, Miyamoto Y, et al. JAK-STAT-dependent regulation of scavenger receptors in LPS-activated murine macrophages[J]. Eur J Pharmacol, 2020, 871: 172940.
- [27] Wang A, Singh K, Ibrahim W, et al. The Promise of JAK inhibitors for treatment of sarcoidosis and other inflammatory disorders with macrophage activation: a review of the literature[J]. Yale J Biol Med, 2020, 93(1): 187–195.

《肿瘤学杂志》关于伦理审查的要求

根据《世界医学协会赫尔辛基宣言》和我国《涉及人的生物医学研究伦理审查办法》等的相关规定以及国际通行的动物福利和伦理准则,为进一步规范医学领域研究程序,保护研究对象的合法权益,本刊对相关论文的投稿提出如下要求:

(1)当论文的主体是以人为研究对象时(包括前瞻性研究、横断面研究、回顾性研究等),作者应当说明是否经所在单位或地区伦理学委员会的批准,是否取得研究对象或其家属的知情同意,并提供该委员会的批准文件复印件以及研究对象或其家属的知情同意书复印件。除此之外,凡涉及临床试验研究(前瞻性研究),作者原则上均应在WHO国际临床试验注册中心(<https://www.who.int/ictrp/en/>)或中国临床试验注册中心(<http://www.chictr.org.cn/index.aspx>)进行注册,并在论文中标注临床试验注册号。

(2)涉及实验动物的研究性论文,需遵守《实验动物管理条例》《实验动物质量管理办法》《善待实验动物指导性意见》的相关规定,并提供该项研究的伦理审查通过证明复印件及相应的动物合格证号。文中需注明所用动物的品种、品系、性别、日龄或月龄、体质量、数量、饲养条件、建模方法和时间、实验起点和终点、处死方法等必要信息。

(3)本刊伦理内容规范书写格式如下:(供参考)

本研究方案经***医院伦理委员会(或实验动物伦理委员会)审批(编号:XXXX),在*** (临床试验注册机构)注册(注册号:XXXX),患者均签署知情同意书(或符合实验室动物管理与使用准则)。