

M2 巨噬细胞来源的 TNFSF13 通过激活 IRF8 对胶质母瘤细胞替莫唑胺耐药的影响

刘文辉¹, 洪文明², 陈佳星¹, 萨日娜¹, 刘娟¹, 张晓丽¹

(¹ 内蒙古医科大学第二附属医院药学部, 呼和浩特 010010;

² 安徽医科大学第一附属医院神经外科, 合肥 230022)

摘要 目的 探讨 M2 巨噬细胞来源的肿瘤坏死因子配体超家族成员 13 (TNFSF13) 通过调控干扰素调节因子 8 (IRF8) 对胶质母瘤 (GBM) 细胞替莫唑胺 (TMZ) 耐药的影响。方法 免疫组织化学法 (IHC) 检测正常脑组织和 GBM 组织中 TNFSF13 的表达, ELISA 检测 M0 型巨噬细胞和 M2 型巨噬细胞条件培养基 (CM) 中 TNFSF13 的表达。M0-CM 和 M2-CM 用于培养 U251 敏感 (U251/S) 细胞和 U251 耐药 (U251/R) 细胞。TMZ 处理组同时加入 800 $\mu\text{mol/L}$ 的 TMZ。U251/R 细胞分为如下组: con 组、M2^{vector}-CM 组、M2^{vector}-CM + TMZ 组、M2^{TNFSF13}-CM 组、M2^{TNFSF13}-CM + TMZ 组、si-IRF8 组、si-IRF8 + M2^{TNFSF13}-CM 组。CCK-8 检测细胞活力并计算 IC_{50} 值, Transwell 实验检测细胞侵袭, 流式细胞术检测凋亡, Western blot 检测 IRF8 的表达。构建裸鼠移植瘤模型并且将裸鼠分为如下组: U251 + M2^{si-NC} 组、U251 + M2^{si-TNFSF13} 组、U251 + M2^{si-NC} + TMZ 组、U251 + M2^{si-TNFSF13} + TMZ 组。检测各组成瘤体积和质量, 免疫组化检测各组肿瘤组织中 TNFSF13 和 CD206 的表达。结果 与癌旁组织以及 M0-CM 比较, 癌组织以及 M2-CM 中 TNFSF13 的表达上调。与 M0-CM 组相比, M2-CM 组中 U251/S 和 U251/R 细胞 TMZ 的 IC_{50} 值和细胞侵袭数目均显著上调 (均 $P < 0.05$)。在 M2 巨噬细胞中过表达 TNFSF13 能够促进 U251/R 细胞 TMZ 的 IC_{50} 值, 促进细胞侵袭、抑制细胞凋亡 (均 $P < 0.05$)。过表达 TNFSF13 促进 IRF8 的表达, 敲低 IRF8 能够减弱过表达 TNFSF13 介导的 U251/R 对 TMZ 耐药。体内研究显示, 敲低 TNFSF13 与 TMZ 单独或联合处理显著抑制肿瘤生长、降低 TNFSF13 和 CD206 的表达。结论 M2 巨噬细胞来源的 TNFSF13 通过激活 IRF8 促进 GBM 细胞 TMZ 耐药。

关键词 M2 巨噬细胞; 胶质母瘤; TNFSF13; IRF8; 替莫唑胺; 耐药

中图分类号 R 739.41

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)11-1931-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.11.007

胶质瘤是神经系统常见的原发性恶性肿瘤, 其中胶质母瘤 (glioblastoma, GBM) 占有胶质瘤的 60% ~ 70%, 是恶性程度最高的胶质瘤类型^[1]。尽管在治疗方面取得了一些进展, 但患者预后仍然较差^[2]。替莫唑胺 (temozolomide, TMZ) 是临床治疗 GBM 的一线化疗药, 然而大部分患者在治疗过程中不可避免的产生耐药性, 严重限制了 TMZ 的治疗效果^[3]。因此, 探索新的治疗靶点和耐药机制具有重大意义。

肿瘤坏死因子配体超家族成员 13 (tumor necrosis factor ligand superfamily member 13, TNFSF13) 也称 APRIL, 以往有研究^[4-5]显示 TNFSF13 在多种肿瘤中高表达并且与胶质瘤中 M2 型巨噬细胞浸润有

关。干扰素调节因子 8 (interferon regulatory factor 8, IRF8) 是干扰素调节因子家族中的一个重要成员, 在调控炎症和肿瘤免疫中起着重要的作用, 研究^[6]表明 IRF8 也在胶质瘤中高表达。此外, 研究^[5]表明 TNFSF13 能够介导 IRF8 的活性。然而, 关于 TNFSF13 调控 IRF8 对 GBM 细胞 TMZ 耐药的影响仍需进一步研究。该研究旨在探讨 M2 巨噬细胞来源的 TNFSF13 调控 IRF8 对 GBM 细胞 TMZ 耐药的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料 BALB/c 裸鼠购自苏州赛业生物科技有限公司 [许可证号: SYXK (苏) 2022-0061]; 人 GBM 细胞系 U251 (货号: Delf-16402)、U87 细胞 (货号: TCHu138)、A172 细胞 (货号: TCHu171)、THP-1 (货号: SCSP-567) 细胞购自中国科学院上海细胞库; TMZ (货号: HY-17364)、CCK-8 试剂盒 (货号: HY-K0301) 购自美国 MedChemExpress 公司;

2024-07-04 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 82003795)

作者简介: 刘文辉, 男, 主管药师;

张晓丽, 女, 主管药师, 通信作者, E-mail: 824806279@

qq.com

Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) (货号: 11965092)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (货号: 12484028) 购自美国 Gibco 公司; TNFSF13 过表达质粒、si-TNFSF13、si-IRF8 以及对应的阴性对照购自上海 GenePharma 公司; 一抗: IRF8 (货号: ab207418)、TNFSF13 (货号: ab189263), HRP-IgG 二抗 (货号: ab6721), TNFSF13 (货号: ab160170) ELISA 试剂盒均购自美国 Abcam 公司; RIPA 裂解液 (货号: abP0013B)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (货号 P0009)、超敏 ECL 化学发光试剂盒 (货号: P0018S) 购自上海 Beyotime Biotechnology 公司; 结晶紫溶液 (货号: G1062) 购自北京 Solarbio 公司; Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (货号: 40302ES20) 购自上海 Yeasen Biotech 公司; 酶标仪 (型号: PR4100) 购自美国 Bio-Rad 公司; 流式细胞仪 (型号: Accuri™ C6 Plus) 购自美国 BD Biosciences 公司; 显微镜 (型号: IX73P2F) 购自日本 OLYMPUS 公司。

1.2 方法

1.2.1 临床样本收集 GBM 组织收集自 2021 年 1 月—2022 年 1 月在内蒙古医科大学第二附属医院神经外科行手术切除的 GBM 患者, 共 21 例, 患者年龄 11~62 (47.54 ± 15.33) 岁, 正常脑组织于该院行颅脑外伤手术的患者中收集, 共 10 例, 患者年龄 13~66 岁, 平均年龄 (46.71 ± 14.28) 岁。所有 GBM 患者均经病理检测确诊为 GBM, 且术前未接受化疗、放疗和免疫治疗等其他治疗。该研究获得该院伦理委员会的批准, 所有参与研究的人员均签署了书面知情同意书。

1.2.2 免疫组织化学法 (immunohistochemistry, IHC) 将临床收集到的脑组织以及后续动物实验中收集的裸鼠肿瘤组织以 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋后切片 ($5 \mu\text{mol/L}$), 之后行常规 IHC 染色, 一抗为抗 TNFSF13 和抗 CD206 抗体, 二抗为辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的 IgG。染色结束后在显微镜下观察染色结果。

1.2.3 生物信息学预测 GEPIA 数据库 (<http://gepia.cancer-pku.cn/detail.php>) 用于预测 IRF8 在 GBM 中的表达及其和 TNFSF13 表达的相关性。

1.2.4 GBM 细胞处理和 TMZ 耐药细胞系的建立 将 U251、U87、A172 细胞依据说明书要求进行培养, 通过将各细胞株暴露在逐渐增加剂量的 TMZ 中筛选对 TMZ 最敏感的细胞纳入后续实验。亲本 U251 细胞 (也称敏感细胞系, 表示为 U251/S)。根

据先前的研究^[7]建立 TMZ 耐药的 U251 细胞 (U251/R), 将 U251 细胞暴露于逐渐增加剂量的 TMZ 中, 直到 $1800 \mu\text{mol/L}$ 。大多数细胞被杀死后, 存活的细胞进行传代培养, 当细胞生长率正常被认为是耐药细胞系的建立成功, 产生的抗 TMZ 细胞表示为 U251/R。

1.2.5 巨噬细胞处理和条件培养基 (conditioned medium, CM) 获取 使用 320 nmol/L 佛波醇 12-肉豆蔻酸 13-乙酸酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) 处理 THP-1 细胞 6 h 以诱导分化为 M0 型巨噬细胞。然后, 使用 IL-4 (20 ng/ml) 和 IL-13 (20 ng/ml) 处理 72 h, 以获得 M2 极化巨噬细胞。将 M0 巨噬细胞和 M2 巨噬细胞分别用无血清的培养基培养 24 h, 收集上清液与含有 10% FBS 的培养基以 1:1 体积混合, 制备 M0-CM 和 M2-CM。

1.2.6 细胞分组 M0-CM 和 M2-CM 用于培养 U251/S 细胞和 U251/R 细胞。M0-CM + TMZ 组和 M2-CM + TMZ 组细胞同时加入 $800 \mu\text{mol/L}$ 的 TMZ 处理。

U251/R 细胞分为如下组, 每组 3×10^5 个细胞: con 组 (U251/R 细胞不做任何处理)、M2^{vector}-CM 组 (转染 vector 的 M2-CM 处理 U251/R 细胞 24 h)、M2^{vector}-CM + TMZ 组 (U251/R 细胞被转染 vector 的 M2-CM 处理, 同时加入 TMZ)、M2^{TNFSF13}-CM 组 (转染 TNFSF13 过表达载体的 M2-CM 处理 U251/R 细胞 24 h)、M2^{TNFSF13}-CM + TMZ 组 (U251/R 细胞被转染 TNFSF13 过表达载体的 M2-CM 处理, 同时加入 TMZ)、si-IRF8 组 (U251/R 细胞转染 si-IRF8)、si-IRF8 + M2^{TNFSF13}-CM 组 (转染 si-IRF8 的 U251/R 细胞被转染 TNFSF13 过表达载体的 M2-CM 处理)。细胞的转染借助 Lipofectamine 3000 试剂依据试剂盒说明书完成。

1.2.7 CCK-8 检测细胞活力 在 96 孔板中接种 $100 \mu\text{l}$ /孔的细胞悬液, 置于培养箱中 24 h 后于每孔加入 $10 \mu\text{l}$ CCK-8 溶液, 并在 37°C 下培养 4 h。终止培养后, 使用酶标仪检测 450 nm 处波每个孔的吸光度值。使用 GraphPad Prism 软件计算 TMZ 的 IC_{50} 值。

1.2.8 Transwell 实验检测细胞侵袭 将各组 GBM 细胞 (细胞 200 个/孔) 接种于 96 孔板中, 在 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养。Transwell 室上腔覆盖 200 mg/ml Matrigel 并且孵育过夜。之后在上腔接种 2×10^3 个 GBM 细胞, 下腔放置含 10% FBS 的 DMEM 培养基作为趋化剂, 孵育 1 d 后去除未侵袭过膜细胞, 固定、结晶紫染色后显微镜下拍照并计数

侵袭细胞。

1.2.9 流式细胞术检测细胞凋亡 各组 GBM 细胞经胰酶消化、PBS 冲洗和离心后弃上清液。细胞重悬于 $1 \times \text{Binding buffer}$ 中,调整细胞浓度为 1×10^5 个/ml。细胞悬液中加入 $5 \mu\text{l}$ AnnexinV-FITC 和 $5 \mu\text{l}$ PI 充分混匀,室温下避光孵育 10 min。上机前加入 $1 \times \text{Binding buffer}$ 补齐总体积至 $500 \mu\text{l}$,使用 AccuriC6 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.2.10 ELISA 检测 CM 中 TNFSF13 的浓度 根据 ELISA 试剂盒的说明,检测各组 CM 中 TNFSF13 的浓度。

1.2.11 Western blot 检测蛋白表达 使用 RIPA 裂解液裂解蛋白并且借助 BCA 法完成蛋白浓度测定后,取 $25 \mu\text{g}$ 总蛋白行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜、封闭后加入一抗 (IRF8) 孵育过夜,次日加入 HRP 标记的二抗孵育 1 h 后行 ECL 显影,Image J 软件分析蛋白水平。

1.2.12 裸鼠成瘤模型 BALB/c 雄性裸鼠 (4 ~ 6 周龄,18 ~ 20 g) 共 20 只,饲养在无特殊病原体的环境中,将裸鼠分为如下组,每组 5 只:U251 + M2^{si-NC} 组、U251 + M2^{si-TNFSF13} 组、U251 + M2^{si-NC} + TMZ 组、U251 + M2^{si-TNFSF13} + TMZ 组。具体处理为:将转染 si-NC 或 si-TNFSF13 的 M2 型巨噬细胞和 U251 细胞以 1 : 1 的比例混合,调整细胞浓度为 5×10^7 个/ml,接种于裸鼠右肋处皮下,每只 0.1 ml。大约 1 周后,皮下肿瘤生长至 50 mm^3 ,TMZ 处理组使用 TMZ

(5 mg/kg) 腹腔注射,每周 5 次。每周用游标卡尺测量皮下肿瘤的大小,计算肿瘤体积 (mm^3) = (长 $\times$ 宽²)/2。第一次治疗后到第 28 天,对所有裸鼠实施安乐死,收集肿瘤组织,称重并拍照。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism 8.0 进行数据分析。数据表示为 $\bar{x} \pm s$ 。多组和两组之间数据统计分别采用单因素方差分析和 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 M2 巨噬细胞促进 GBM 细胞 TMZ 耐药 将 U251、U87、A172 细胞在含有 TMZ 的培养液中培养 48 h,通过逐渐增加 TMZ 浓度,并使用 CCK-8 检测细胞活力显示,TMZ 对 U251 细胞活力的抑制最明显,因此,选择此细胞构建耐药细胞株,并进行后续实验 (图 1A)。

为了研究 M2 巨噬细胞对 GBM 细胞 TMZ 耐药的影响。分别用 M0-CM 和 M2-CM 培养 U251/S 和 U251/R 细胞,并使用不同浓度 TMZ 处理 (0 ~ 1 800 $\mu\text{mol/L}$) 48 h。CCK-8 检测细胞并计算 IC₅₀。结果显示,与 M0-CM 组相比,M2-CM 组中 TMZ 在 U251/S 和 U251/R 细胞中的 IC₅₀ 值均显著上调 ($P < 0.05$,图 1B)。Transwell 实验结果表明,与 M0-CM + TMZ 组相比,M2-CM + TMZ 组细胞侵袭数目显著增多 ($q_{\text{U251/S}} = 4.828, q_{\text{U251/R}} = 8.055, P < 0.05$) (图 1C)。

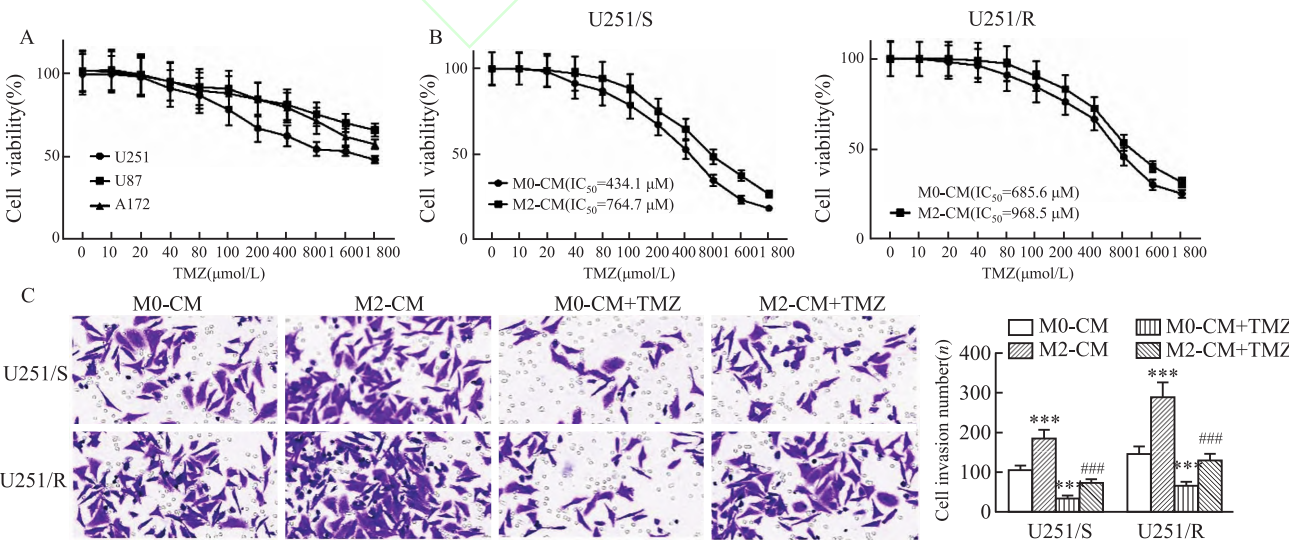


图 1 M2 巨噬细胞促进 GBM 细胞 TMZ 耐药

Fig. 1 M2 macrophages promoted TMZ resistance in GBM cells

A: Results of cell viability of each group; B: IC₅₀ measurement of each group; C: Number of cell invasion in each group $\times 400$; *** $P < 0.001$ vs M0-CM group; ### $P < 0.001$ vs M0-CM + TMZ group.

2.2 TNFSF13 水平在 GBM 组织和 M2 巨噬细胞中增强 为了研究 TNFSF13 在 GBM 中的表达特点,该研究采用 IHC 检测 GBM 组织和对照组脑组织中 TNFSF13 的表达。结果显示,TNFSF13 在 GBM 组织中的表达明显高于正常脑组织(图 2A)。ELISA 检测 M0-CM 和 M2-CM 中 TNFSF13 的浓度。结果显示,与 M0-CM 组相比,M2-CM 中 TNFSF13 的浓度明显上调($t=9.584, P<0.05$,图 2B)。

2.3 M2 巨噬细胞分泌的 TNFSF13 增强 GBM 细胞 TMZ 耐药 为了研究 TNFSF13 对 GBM 细胞对 TMZ 耐药的影响,该研究将 vector、TNFSF13 过表达质粒转染至 M2 巨噬细胞中,将 M2^{vector}-CM、

M2^{TNFSF13}-CM 与 U251/R 细胞共培养,在此基础上使用不同浓度 TMZ(0 ~ 1 800 $\mu\text{mol/L}$)处理 U251/R 细胞。CCK-8 检测细胞活力并计算 IC₅₀值。结果显示,TMZ 在 M2^{TNFSF13}-CM 处理的 U251/R 细胞中的 IC₅₀值(1 414 $\mu\text{mol/L}$)显著高于 M2^{vector}-CM 处理的 U251/R 细胞(IC₅₀值:903.8 $\mu\text{mol/L}$)($P<0.05$)(图 3A)。使用 TMZ(1 200 $\mu\text{mol/L}$)处理巨噬细胞 CM 共培养的 U251/R 细胞。Transwell 和流式细胞术检测结果显示,与 M2^{vector}-CM + TMZ 组相比,M2^{TNFSF13}-CM + TMZ 组细胞侵袭显著增加($q=14.63, P<0.05$)(图 3B),细胞凋亡明显减少($q=5.528, P<0.05$,图 3C)。

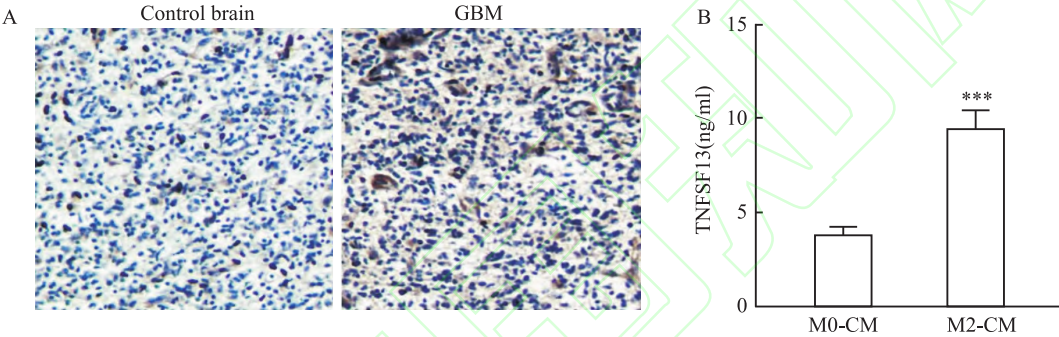


图2 TNFSF13 在 GBM 组织和 M2 巨噬细胞中高表达 ×400

Fig. 2 TNFSF13 was highly expressed in GBM tissues and M2 macrophages ×400

A: Expression of TNFSF13 in GBM and control brain; B: Results of TNFSF13 expression in M0-CM and M2-CM; *** $P<0.001$ vs M0-CM group.

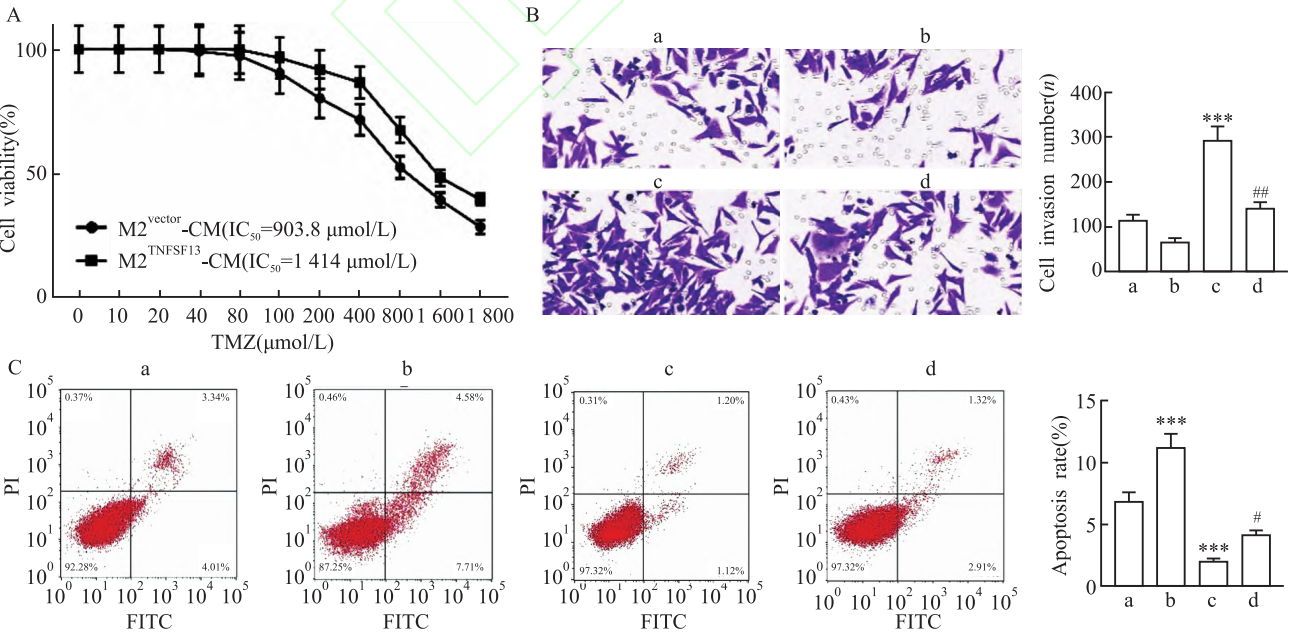


图3 M2 巨噬细胞分泌的 TNFSF13 增强 GBM 细胞 TMZ 耐药

Fig. 3 TNFSF13 secreted by M2 macrophages enhanced TMZ resistance in GBM cells

A: IC₅₀ determination results of cells in each group; B: Number of cell invasion in each group ×400; C: Results of cell apoptosis rate measurement in each group; a: M2^{vector}-CM group; b: M2^{vector}-CM + TMZ group; c: M2^{TNFSF13}-CM group; d: M2^{TNFSF13}-CM + TMZ group; * $P<0.05$, *** $P<0.001$ vs M2^{vector}-CM group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs M2^{vector}-CM + TMZ group.

2.4 M2 巨噬细胞分泌的 TNFSF13 上调 IRF8 的表达 为了研究 M2 巨噬细胞分泌的 TNFSF13 在 GBM 中作用的机制。GEPIA 数据库分析显示 IRF8 在 GBM 中表达上调(图 4A)。此外 GEPIA 数据库预测 TNFSF13 和 IRF8 呈正相关(图 4B)。Western blot 检测 IRF8 的表达。结果显示,与 M2^{vector}-CM 组相比,在 M2 巨噬细胞中过表达 TNFSF13 显著上调 IRF8 的表达($t=4.340, P<0.05$)(图 4C)。

2.5 敲低 IRF8 减弱 M2 巨噬细胞分泌的 TN-

FSF13 在 GBM 中介导的促癌作用 为了验证 TNFSF13 在 GBM 中的作用机制。该研究将 si-NC 和 si-IRF8 转染至 U251/R 细胞,过表达 TNFSF13 的 M2 巨噬细胞 CM 处理上述细胞。结果显示,与 con 组相比,敲低 IRF8 抑制细胞活力($q=6.599$)和侵袭($q=4.106$),促进细胞凋亡($q=7.822$)。与 TNFSF13 组相比,敲低 IRF8 抑制细胞活力($q=8.837$)和侵袭($q=18.28$),促进细胞凋亡($q=10.14$)(均 $P<0.05$)。见图 5。

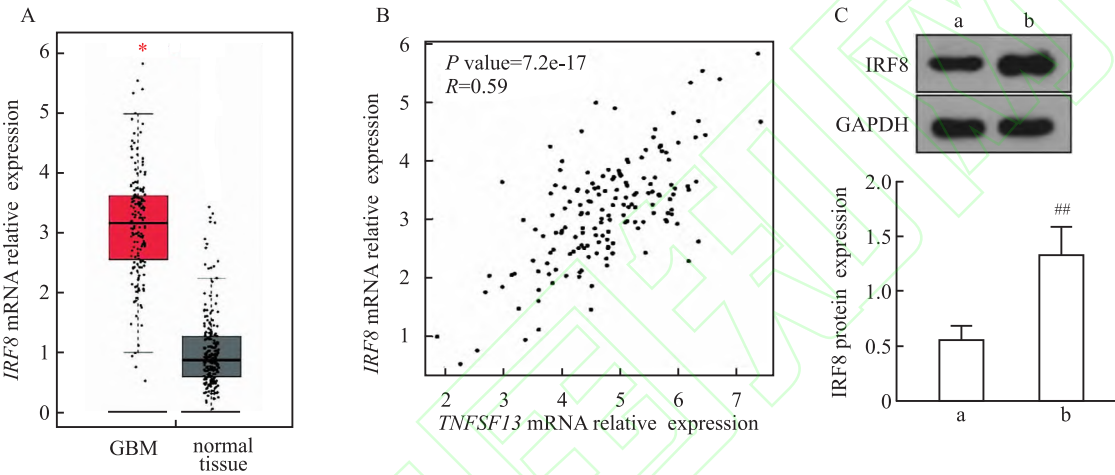


图 4 M2 巨噬细胞分泌的 TNFSF13 上调 IRF8 的表达

Fig. 4 The TNFSF13 secreted by M2 macrophages upregulated IRF8 expression

A: GEPIA database showed high expression of IRF8 in GBM; B: GEPIA database predicted positive mRNA correlation of TNFSF13 and IRF8 in GBM; C: protein expression of IRF8 in cells of each group; a: M2^{vector}-CM group; b: M2^{TNFSF13}-CM group; * $P<0.05$ vs normal tissue; ## $P<0.01$ vs M2^{vector}-CM group.

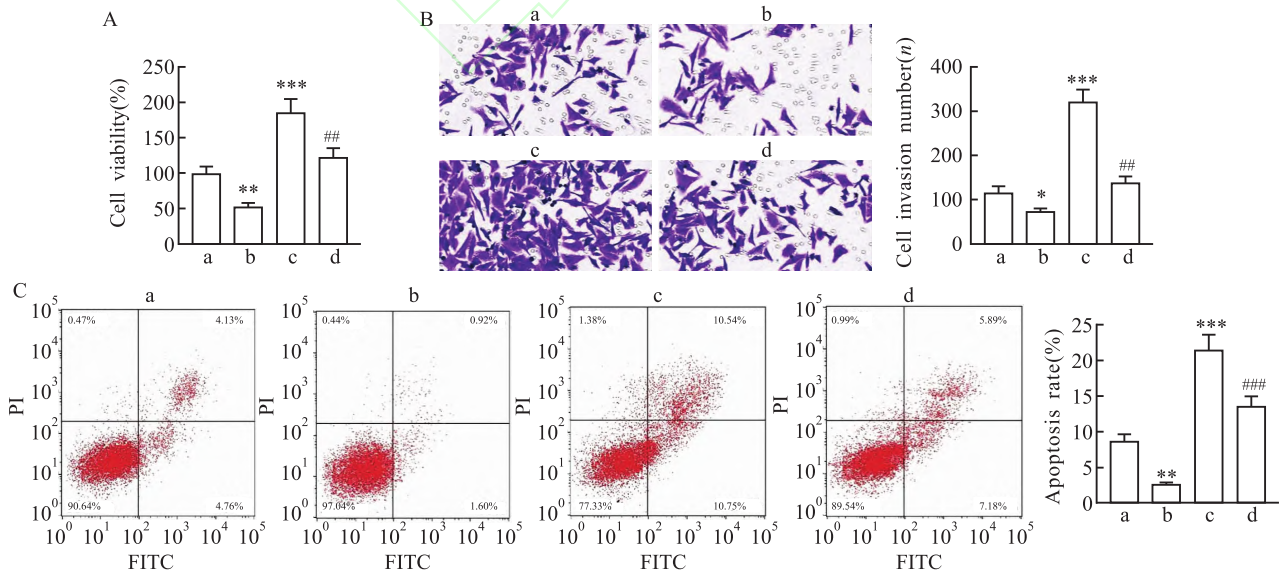


图 5 敲低 IRF8 减弱 M2 巨噬细胞分泌的 TNFSF13 在 GBM 中介导的促癌作用

Fig. 5 Knockdown of IRF8 attenuates the pro-oncogenic effects of TNFSF13 secreted by M2 macrophages in GBM

A: Results of cell viability in each group; B: Number of cell invasion in each group $\times 400$; C: Results of apoptosis rate in each group; a: con group; b: si-IRF8 group; c: M2^{TNFSF13}-CM group; d: si-IRF8 + M2^{TNFSF13}-CM group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs con group; ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ vs M2^{TNFSF13}-CM group.

2.6 在 M2 巨噬细胞中敲低 TNFSF13 抑制肿瘤的生长并增强对 TMZ 的敏感性 将 U251 细胞与 M2^{si-NC} 或 M2^{si-TNFSF13} 混合接种构建异种移植瘤模型, 使用 TMZ 治疗, 实验示意图见图 6A。实验结果显示, 与 U251 + M2^{si-NC} 组相比, 在 M2 巨噬细胞中敲低 TNFSF13 或使用 TMZ 治疗显著抑制肿瘤的生长。与 U251 + M2^{si-NC} + TMZ 组相比, U251 + M2^{si-TNFSF13} + TMZ 组异种移植瘤表现出明显的生长抑制(图 6B-6D)。IHC 染色检测 TNFSF13 和 CD206 的表达。结果显示, 与 U251 + M2^{si-NC} 组相比, U251 + M2^{si-TNFSF13} 组和 U251 + M2^{si-NC} + TMZ 组 TNFSF13 和 CD206 的表达下调。与 U251 + M2^{si-NC} + TMZ 组相比, U251 + M2^{si-TNFSF13} + TMZ 组 TNFSF13 和 CD206 的表达进一步下调(图 6E)。

3 讨论

该研究结果表明, M2 巨噬细胞能够增强 GBM 细胞对 TMZ 的耐药性。进一步研究表明, TNFSF13 在 GBM 组织和 M2 巨噬细胞中高表达, 过表达 TNFSF13 不仅促进了 GBM 细胞活力和侵袭, 还上调了 IRF8 的表达。因此, 作者推断 M2 巨噬细胞在 GBM 细胞的生长、生存和耐药中发挥了重要作用, 而 TNFSF13 是一个关键的调节因子, 可能为 GBM 治疗提供新的理论基础。

据文献^[8]报道, 炎性微环境能够影响 GBM 细胞复杂的异质性并诱导细胞侵袭和耐药。GBM 的肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)由肿瘤细胞和非肿瘤细胞组成, 小胶质细胞和骨髓来源的

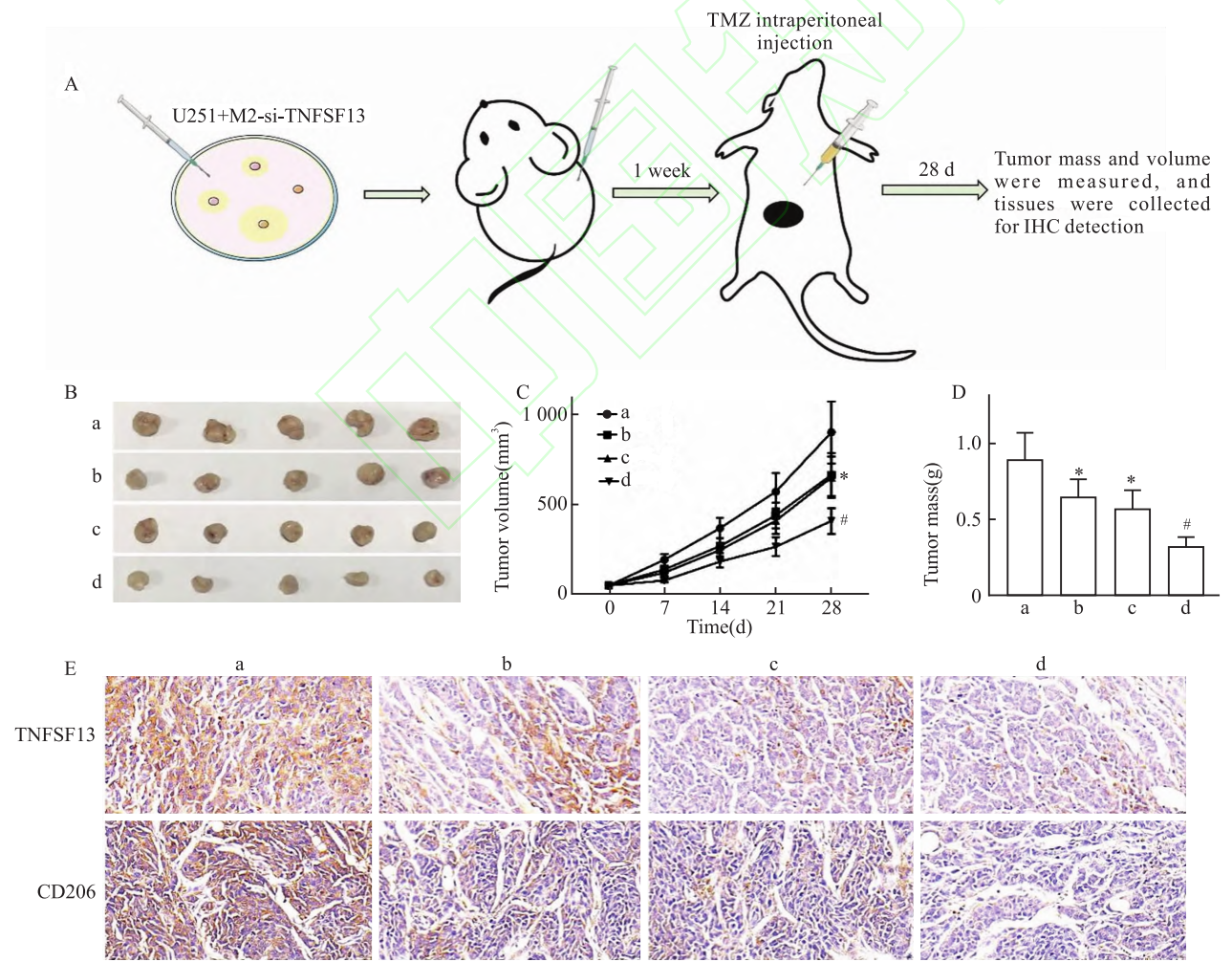


图 6 在 M2 巨噬细胞中敲低 TNFSF13 抑制肿瘤的生长并增强对 TMZ 的敏感性

Fig.6 Knockdown of TNFSF13 in M2 macrophages inhibited tumor growth and enhanced sensitivity to TMZ

A: Schematic diagram of the experiment; B: Tumor diagram of each group; C: Volume of each group; D: Tumor mass of each group; E: Measurement of TNFSF13 and CD206 expression by IHC staining $\times 400$; a: U251 + M2^{si-NC} group; b: U251 + M2^{si-TNFSF13} group; c: U251 + M2^{si-NC} + TMZ group; d: U251 + M2^{si-TNFSF13} + TMZ group; * $P < 0.05$ vs U251 + M2^{si-NC} group; # $P < 0.05$ vs U251 + M2^{si-NC} + TMZ group.

巨噬细胞约占 TME 中所有细胞类型的 30% ~ 50%, 通常被称为肿瘤相关小胶质细胞/巨噬细胞^[9]。巨噬细胞能够极化为 2 种表型: M1 型和 M2 型, M2 型巨噬细胞被证实能够促进 GBM 细胞恶性生物学行为^[10]。此外, M2 极化的巨噬细胞有助于 GBM 的 TMZ 耐药^[11]。另有文献^[12]报道通过促进巨噬细胞的 M1 样极化可以增强胶质瘤细胞对 TMZ 的敏感性。该研究表明 M2 巨噬细胞 CM 上调 TMZ 在 U251/S 或 U251/R 细胞中的 IC₅₀ 值, 增强 GBM 细胞侵袭能力。这些结果表明, M2 型巨噬细胞在 GBM 细胞生长方面发挥了重要作用, 并且增强了 GBM 细胞对 TMZ 的化学抗性, 这可能为 GBM 细胞耐药的治理提供新的思路。

TNFSF13 是一种 II 型跨膜蛋白, 通过蛋白水解裂解以可溶性同源三聚体形式(即活性形式)释放, 参与调控 B 细胞生长、成熟以及肿瘤的生长和侵袭^[13]。关于胃淋巴瘤的研究^[14]表明, TNFSF13 几乎完全由胃淋巴瘤浸润的巨噬细胞产生, 且能够促进胃淋巴瘤的进展。此外, 关于胶质瘤的研究也表明 TNFSF13 主要来自于肿瘤细胞和 M2 巨噬细胞^[5]。Pelekanou et al^[13]认为 TNFSF13 是诱导乳腺癌耐药的一种可能的新机制。该研究表明 TNFSF13 在 GBM 组织中高表达, 且在 M2 型巨噬细胞中表达上调。进一步研究表明过表达巨噬细胞中 TNFSF13 可以增强 GBM 细胞对 TMZ 的耐药性, 并促进 GBM 细胞的侵袭和抑制凋亡。

通过 GEPIA 数据库预测显示 IRF8 在 GBM 中表达上调, 且 TNFSF13 与 IRF8 的表达呈正相关。Western blot 结果表明 TNFSF13 上调 IRF8 的表达。IRF8 作为一种免疫逃逸相关转录因子与 GBM 低生存率有关^[15]。此外, 有报道^[5]称 TNFSF13 在 M2 巨噬细胞中过表达, 并且可以上调 IRF8 的表达。该研究结果显示, TNFSF13 在 GBM 中具有重要作用, 而敲低 IRF8 减弱 M2 巨噬细胞分泌的 TNFSF13 在 GBM 诱导的化疗药耐药。

综上所述, M2 巨噬细胞来源的 TNFSF13 是 GBM 细胞 TMZ 耐药的关键因素。M2 巨噬细胞分泌的 TNFSF13 可以通过激活 IRF8 增强 GBM 细胞的 TMZ 耐药。该研究也存在一定局限性, 如该研究仅仅考察了单一的机制, 后续还需进一步研究和验证其他可能存在的机制。此外, 该研究只对 TMZ 耐药相关机制展开了研究, 还需对其他抗肿瘤药物进行研究以综合评估 M2 巨噬细胞来源的 TNFSF13 对 GBM 治疗中的作用。因此, 未来需要开展更多的研

究工作, 以克服这些局限性和不足, 全面阐述 M2 巨噬细胞在 GBM 细胞 TMZ 耐药性中的作用机制。

参考文献

- [1] 徐源, 杨杰, 姜健楠, 等. 沉默 lncRNA RNF185-AS1 通过靶向 miR-637/HMGA1 抑制胶质瘤细胞增殖和侵袭[J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(8): 1235–9. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2022.08.011.
- [1] Xu Y, Yang J, Jiang J N, et al. Silencing the expression of lncRNA RNF185-AS1 inhibits the proliferation and invasion of glioma cells by targeting miR-637/HMGA1[J]. Acta Univ Med Anhui, 2022, 57(8): 1235–9. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2022.08.011.
- [2] Barnholtz-Sloan J S, Ostrom Q T, Cote D. Epidemiology of brain tumors[J]. Neurol Clin, 2018, 36(3): 395–419. doi:10.1016/j.ncl.2018.04.001.
- [3] Yan Y, Wei W, Long S, et al. The role of RNA modification in the generation of acquired drug resistance in glioma[J]. Front Genet, 2022, 13: 1032286. doi:10.3389/fgene.2022.1032286.
- [4] Nowacka K H, Jabłońska E. Role of the APRIL molecule in solid tumors[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2021, 61: 38–44. doi:10.1016/j.cytogfr.2021.08.001.
- [5] Chen R, Wang X, Dai Z, et al. TNFSF13 is a novel onco-inflammatory marker and correlates with immune infiltration in gliomas[J]. Front Immunol, 2021, 12: 713757. doi:10.3389/fimmu.2021.713757.
- [6] Lei J, Zhou M H, Zhang F C, et al. Interferon regulatory factor transcript levels correlate with clinical outcomes in human glioma[J]. Aging, 2021, 13(8): 12086–98. doi:10.18632/aging.202915.
- [7] Wang Z H, Li J, Liu Q, et al. A modified nucleoside O6-methyl-2'-deoxyguanosine-5'-triphosphate exhibits anti-glioblastoma activity in a caspase-independent manner[J]. Pharmacol Res, 2024, 199: 106990. doi:10.1016/j.phrs.2023.106990.
- [8] DeCordova S, Shastri A, Tsolaki A G, et al. Molecular heterogeneity and immunosuppressive microenvironment in glioblastoma[J]. Front Immunol, 2020, 11: 1402. doi:10.3389/fimmu.2020.01402.
- [9] Tan Y Q, Li Y T, Yan T F, et al. Six immune associated genes construct prognostic model evaluate low-grade glioma[J]. Front Immunol, 2020, 11: 606164. doi:10.3389/fimmu.2020.606164.
- [10] 张宝瑞, 马春晓, 秦历杰. STAT1 诱导的 LINC00987 调节 miR-223-3p/FZD4 促进人胶质母细胞瘤相关巨噬细胞向 M2 型极化[J]. 基础医学与临床, 2023, 43(7): 1060–8.
- [10] Zhang B R, Ma C X, Qin L J. STAT1-induced LINC00987 regulates miR-223-3p/FZD4 and promotes M2-type polarization of human glioblastoma-associated macrophages[J]. Basic Clin Med, 2023, 43(7): 1060–8.
- [11] Zhang G, Tao X, Ji B, et al. Hypoxia-driven M2-polarized macrophages facilitate cancer aggressiveness and temozolomide resistance

- in glioblastoma [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 1614336. doi:10.1155/2022/1614336.
- [12] Li Z, Fu W J, Chen X Q, et al. Autophagy-based unconventional secretion of HMGB1 in glioblastoma promotes chemosensitivity to temozolomide through macrophage M1-like polarization[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 74. doi:10.1186/s13046-022-02291-8.
- [13] Pelekanou V, Notas G, Athanasouli P, et al. BCMA (TNFRSF17) induces APRIL and BAFF mediated breast cancer cell stemness[J]. *Front Oncol*, 2018, 8: 301. doi:10.3389/fonc.2018.00301.
- [14] Munari F, Lonardi S, Cassatella M A, et al. Tumor-associated macrophages as major source of APRIL in gastric MALT lymphoma [J]. *Blood*, 2011, 117(24): 6612-6. doi:10.1182/blood-2010-06-293266.
- [15] Chen X, Chen Y, Chen X, et al. Single-cell RNA sequencing reveals intra-tumoral heterogeneity of glioblastoma and a pro-tumor subset of tumor-associated macrophages characterized by EZH2 overexpression[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2022, 1868(12): 166534. doi:10.1016/j.bbadis.2022.166534.

M2 macrophage-derived TNFSF13 affects temozolomide resistance in glioblastoma cells by activating IRF8

Liu Wenhui¹, Hong Wenming², Chen Jiaying¹, Sa Rina¹, Liu Juan¹, Zhang Xiaoli¹

(¹Dept of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010010;

²Dept of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the impact of tumor necrosis factor ligand superfamily member 13 (TNFSF13) derived from M2 macrophages on temozolomide (TMZ) resistance *via* regulating interferon regulatory factor 8 (IRF8) in glioblastoma (GBM) cells. **Methods** Immunohistochemistry (IHC) was used to detect the expression of TNFSF13 in normal brain tissues and GBM tissues. ELISA was used to measure the expression of TNFSF13 in the conditioned media (CM) of M0-type macrophages and M2-type macrophages. M0-CM and M2-CM were used to culture U251 sensitive (U251/S) and resistant (U251/R) cells. The TMZ treatment group was also treated with 800 $\mu\text{mol/L}$ TMZ. The U251/R cells were divided into the following groups: con group, M2^{vector}-CM group, M2^{vector}-CM + TMZ group, M2^{TNFSF13}-CM group, M2^{TNFSF13}-CM + TMZ group, si-IRF8 group, and si-IRF8 + M2^{TNFSF13}-CM group. CCK-8 assay was used to detect cell viability and calculate the IC₅₀ value. Transwell assay was used to detect cell invasion. Flow cytometry was used to detect apoptosis. Western blot was used to detect the expression of IRF8. Nude mouse xenograft models were constructed and the nude mice were divided into the following groups: U251 + M2^{si-NC} group, U251 + M2^{si-TNFSF13} group, U251 + M2^{si-NC} + TMZ group, U251 + M2^{si-TNFSF13} + TMZ group. The tumor volume and mass of each group were measured, and IHC was used to detect the expression of TNFSF13 and CD206 in tumor tissues of each group. **Results** Compared with adjacent tissues and M0-CM, the expression of TNFSF13 was up-regulated in cancer tissues and M2-CM. Compared with the M0-CM group, the IC₅₀ value of TMZ and the number of cell invasions in U251/S and U251/R cells in the M2-CM group significantly increased (all $P < 0.05$). Overexpression of TNFSF13 in M2 macrophages could promote the IC₅₀ value of TMZ in U251/R cells, promote cell invasion, and inhibit cell apoptosis (all $P < 0.05$). Overexpression of TNFSF13 promoted the expression of IRF8, and knocking down IRF8 could attenuate the TMZ resistance of U251/R mediated by overexpression of TNFSF13. *In vivo* studies showed that knocking down TNFSF13 alone or combined with TMZ treatment significantly inhibited tumor growth and reduced the expression of TNFSF13 and CD206. **Conclusion** TNFSF13 derived from M2 macrophages promotes TMZ resistance in GBM cells by activating IRF8.

Key words M2 macrophages; glioblastoma; TNFSF13; IRF8; temozolomide; drug resistance

Fund program National Natural Science Foundation of China (No. 82003795)

Corresponding author Zhang Xiaoli, E-mail: 824806279@qq.com