

网络出版时间:2025-06-04 10:53:54 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250604.0906.001

# 高转移性结直肠癌细胞通过分泌 KLF4 诱导 M2 型巨噬细胞极化对结直肠癌免疫逃逸的影响

尚靖<sup>1,2</sup>, 路畅<sup>3</sup>, 侯阳波<sup>4</sup>, 袁沁<sup>3</sup>, 李炜<sup>3</sup>, 王海静<sup>5</sup>, 陈进宝<sup>1</sup>(上海中医药大学附属普陀医院<sup>1</sup> 中医肿瘤科、<sup>2</sup> 放射科、<sup>3</sup> 普外科、<sup>4</sup> 神经内科、<sup>5</sup> 药学部, 上海 200062)

**摘要** **目的** 探讨高转移性结直肠癌细胞 HCT116 诱导 M2 型巨噬细胞极化对结直肠癌免疫逃逸的影响及其机制。**方法** 将结直肠癌细胞条件培养基(CM)与佛波酯(PMA)诱导的 M0 型巨噬细胞共培养后,通过流式细胞术、实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)和酶联免疫吸附试验(ELISA)观察 M2 型巨噬细胞极化状态;将 CM<sub>M0</sub>、CM<sub>SW480-Mφ</sub> 和 CM<sub>HCT116-Mφ</sub> 与 HCT116 细胞共培养后,通过 Western blot 和 qPCR 检测程序性死亡受体配体 1(PD-L1)的表达情况,同时将刺激后的 HCT116 细胞与人源 T 淋巴细胞共培养,检测 HCT116 细胞存活情况及上清液中的肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和干扰素-γ(IFN-γ)水平;用 Western blot、qPCR 和 ELISA 检测 SW480 和 HCT116 细胞中 Kruippel 样因子 4(KLF4)表达差异;用 KLF4 抑制剂肯帕罗酮(Ken)预处理 HCT116 细胞后,将 CM<sub>HCT116-Mφ</sub> 和 CM<sub>(HCT116+Ken)-Mφ</sub> 与 M0 型巨噬细胞共培养,通过流式细胞术、qPCR、ELISA 实验观察 M2 型巨噬细胞极化状态。将 CM<sub>HCT116-Mφ</sub> 和 CM<sub>(HCT116+Ken)-Mφ</sub> 与 HCT116 细胞共培养后,通过 Western blot 和 qPCR 检测 PD-L1 的表达情况。**结果** M0 型巨噬细胞在 CM 刺激后,HCT116-Mφ 细胞中 CD11b<sup>+</sup> CD206<sup>+</sup> 细胞比例更高,M2 型巨噬细胞标志物白细胞介素(IL)-10 及转化生长因子-β(TGF-β)表达更高;相比于 CM<sub>SW480-Mφ</sub> 组,CM<sub>HCT116-Mφ</sub> 组的 PD-L1 蛋白表达水平更高;与 T 淋巴细胞共培养后,CM<sub>HCT116-Mφ</sub> 组细胞存活最多,同时 TNF-α 和 IFN-γ 水平最低;加入 Ken 后,M2 型巨噬细胞极化比例及标志物均降低。与 CM<sub>HCT116-Mφ</sub> 组相比,CM<sub>(HCT116+Ken)-Mφ</sub> 组 HCT116 细胞 PD-L1 表达下降。**结论** 高转移性结直肠癌细胞通过分泌 KLF4 诱导 M2 型巨噬细胞极化促进结直肠癌细胞 PD-L1 表达,促进肿瘤免疫逃逸。该研究有望为提高临床免疫治疗效果提供潜在靶点。

**关键词** 高转移性结直肠癌细胞;KLF4;肿瘤相关巨噬细胞;免疫逃逸;PD-L1

**中图分类号** R 735.3

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2025)06-1036-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.06.009

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是常见的消化道恶性肿瘤,因其症状隐匿,多数患者在确诊时已发生转移,而治疗转移性结直肠癌(metastatic colorectal cancer, mCRC)的手段有限,预后极差,其 5 年生存率仅为 14%<sup>[1]</sup>。近几年来癌症免疫治疗取得了新进展,但 mCRC 患者对免疫治疗反应较差,其机制可能与肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated

macrophages, TAMs)介导的免疫逃逸密切相关<sup>[2]</sup>。

Kruippel 样因子 4(Kruippel-like factor 4, KLF4)是一种包含锌指结构的转录因子,可调节细胞生长、增殖和分化等生物过程,并与肿瘤等疾病密切相关<sup>[3]</sup>。Zhou et al<sup>[4]</sup>指出过表达 KLF4 可能通过诱导上皮间质转化和 β-catenin 核转位来促进 NCM460 和 HCT116 细胞的迁移和侵袭。Arora et al<sup>[5]</sup>指出 KLF4 不仅具有调节非小细胞肺癌微环境中的 M2 型巨噬细胞的极化作用,且与免疫逃逸密切相关,进而促进肿瘤的发生发展。该研究旨在探究高转移性结直肠细胞 HCT116<sup>[6]</sup>是否通过分泌 KLF4 诱导 M2 型巨噬细胞极化促进结直肠癌免疫逃逸。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞系** 结直肠癌细胞(SW480 和 HCT116)和人单核细胞白血病细胞 THP1 购于中国科学院上海生命科学研究院。

2025-04-23 接收

基金项目:上海市启明星基金(扬帆专项)(编号:22YF1441400);上海市普陀区卫生健康系统科技创新项目(编号:ptkwws202409);上海市第六人民医院联合共建科学研究基金(编号:23-LY-03);上海中医药大学附属普陀医院百人计划(编号:2022-RCLH-03);上海中医药大学预算内项目(编号:2021LK055);上海市卫生健康系统重点学科计划(编号:2024ZDXK0046)

作者简介:尚靖,男,硕士,住院医师;

陈进宝,男,硕士,住院医师,通信作者,E-mail:1976988891@qq.com;

王海静,女,硕士,初级药师,通信作者,E-mail:wanghj0307@163.com

**1.1.2 主要试剂** RPMI-1640 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、青链霉素溶液和胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;佛波酯 (phorbol myristate acetate, PMA) 购自美国 Sigma 公司;CD11b-PE 抗体和 CD206-FITC 抗体购自美国 BD Pharmingen 公司;RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒和实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 试剂盒购自江苏艾瑞克生物科技有限公司;白细胞介素 (interleukin, IL)-10 和转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;KLF4 ELISA 试剂盒购自上海威奥生物科技有限公司;蛋白样品制备及 SDS-PAGE 电泳相关试剂购自上海碧云天生物技术有限公司;程序性死亡受体配体 1 (programmed death-ligand 1, PD-L1) 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;KLF4 抗体购自杭州华安生物技术有限公司; $\beta$ -actin 抗体购自英国 Abcam 公司;KLF4 抑制剂肯帕罗酮 (Kenpaullone, Ken) 购自美国 MedChemExpress 公司;Percoll 溶液购自美国 Cytiva 公司;肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和干扰素- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ) ELISA 试剂盒购自深圳欣博盛生物科技有限公司;细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) 试剂盒购自日本 DOJINDO 公司。

**1.1.3 主要仪器** 细胞恒温培养箱 (型号: HERA-cell240i) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;酶标仪 (货号: BioRad-680) 购自美国 Beckman Coulter 公司;凝胶成像仪 (货号: Gel-DocEQ) 购自美国 Beckman Coulter 公司;垂直电泳仪 (货号: 165-8001) 购自美国 Beckman Coulter 公司;流式细胞仪 (货号: CytoFLEX LX) 购自美国 Beckman Coulter 公司;PCR 仪 (货号: ABI7300) 购自美国 Applied Biosystems 公司;电热恒温水浴锅 (货号: DK-8D) 购自上海精宏实验设备有限公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养** SW480、HCT116 和 THP1 细胞用 RPMI-1640 完全培养基 (含 10% FBS 和 1% 双抗) 培养在 37 °C 含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中。THP1 细胞 ( $2 \times 10^6$  个/孔) 接种至 6 孔板, 用含 200 ng/ml PMA 的完全培养基刺激 48 h 诱导为贴壁的 M0 细胞。

**1.2.2 条件培养基 (conditioned medium, CM) 收集** SW480 细胞和 HCT116 细胞铺 6 孔板 ( $5 \times 10^4$  个/孔), 过夜贴壁后更换为无血清 RPMI-1640 培养

基, 饥饿 48 h 后获得相应的 CM; 用 CM<sub>SW480</sub> 和 CM<sub>HCT116</sub> 刺激 M0 细胞 48 h 分别获得 SW480-M $\phi$  细胞和 HCT116-M $\phi$  细胞; 用 KLF4 抑制剂 Ken 预处理 HCT116 细胞后获得相应的 (HCT116 + Ken)-M $\phi$  细胞; 所诱导的巨噬细胞用无血清 RPMI-1640 培养基饥饿 48 h 后获得相应的 CM。

**1.2.3 流式细胞术** 不同肿瘤细胞 CM 刺激 M0 48 h 后, 收集细胞 ( $1 \times 10^6$  个) 加入流式抗体, 避光孵育 15 min, 用流式仪器检测。

**1.2.4 qPCR** 提取细胞总 RNA 和逆转录, 经 qPCR 反应, 以  $\beta$ -actin 为内参, 用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法计算相对表达水平, 引物序列如下: IL-10, (F) 5'-TGCCTTCAGCAGAGTGAAGA-3', (R) 5'-GGTCTTGGTTCTCAGCTTGG-3'; TGF- $\beta$ , (F) 5'-GGGACTATCCACCTGCAAGA-3', (R) 5'-CCTCCTTGGCGTAGTAGTCG-3'; PD-L1, (F) 5'-TTTGCTGAACGCCCCATA-3', (R) 5'-TGCTTGTCCAGATGACTTCG-3'; KLF4, (F) 5'-ACGATCGTGGCCCCGAAAAGGAC-3', (R) 5'-CAACAACCGAAAATGCACCAGCCCCAG-3';  $\beta$ -actin, (F) 5'-ATTGCCGACAGGATGCAGAA-3', (R) 5'-GCTGATCCACATCTGCTGGAA-3'。

**1.2.5 ELISA** CM 按照 1.2.2 所描述的方法收集, 根据说明书检测 CM<sub>M0</sub>、CM<sub>SW480-M $\phi$</sub> 、CM<sub>HCT116-M $\phi$</sub>  和 CM<sub>(HCT116 + Ken)-M $\phi$</sub>  中 IL-10、TGF- $\beta$  的水平; 在 CM<sub>SW480</sub> 和 CM<sub>HCT116</sub> 中检测的 KLF4 水平。

**1.2.6 Western blot 法** 制备的蛋白样品, 经上样、电泳和转膜后将蛋白转移至 PVDF 膜上, 封闭后, 将其裁剪后加入相应的一抗, 包括 PD-L1 (1 : 1 000)、KLF4 (1 : 2 000) 和  $\beta$ -actin (1 : 5 000), 在 4 °C 过夜, 次日与对应的二抗孵育后显影。

**1.2.7 人外周血 T 淋巴细胞与结直肠癌细胞共培养** HCT116 细胞 ( $2 \times 10^4$  个/孔) 铺 24 孔板, 并分别用 CM<sub>M0</sub>、CM<sub>SW480-M $\phi$</sub> 、CM<sub>HCT116-M $\phi$</sub>  刺激 48 h; 根据说明书用 Percoll 淋巴细胞分离液分离出 T 淋巴细胞, 随后与 CM 刺激后 HCT116 细胞以 1 : 10 的比例共培养 24 h, 用结晶紫染色, 收集上清液用 ELISA 试剂盒对细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  进行检测。

**1.2.8 CCK-8 实验** 96 孔板接种 HCT116 细胞, 贴壁后, 加入不同浓度 Ken 的培养基刺激 48 h, 加入 CCK-8 工作液孵育 30 min 后测吸光度值。

**1.3 统计学处理** 每个实验均重复 3 次, 结果用表示, 用 GraphPad Prism 进行作图及统计分析, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 两组之间比较采用非配对  $t$  检验进行统计分析,  $P < 0.05$

为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 高 mCRC 细胞对 M2 型巨噬细胞极化的影响

用流式细胞术检测 SW480-M $\phi$  细胞和 HCT116-M $\phi$  细胞中 CD11b<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> 细胞 (M2 型巨噬细胞) 比例,与 M0 相比,SW480-M $\phi$  和 HCT116-M $\phi$  中 M2 型巨噬细胞极化比例升高,且 HCT116-M $\phi$  中 M2 型巨噬细胞比例更高 (图 1A,  $F = 56.29$ ,  $P < 0.001$ )。同时, qPCR 实验 (图 1B,  $F_{IL-10} = 114.7$ ,  $F_{TGF-\beta} = 88.59$ ,  $P < 0.001$ ) 与 ELISA 实验 (图 1C,  $F_{IL-10} = 70.83$ ,  $F_{TGF-\beta} = 55.17$ ,  $P < 0.001$ ) 表明, M2 型巨噬细胞的生物标志物 IL-10 和 TGF- $\beta$  水平也具有同样的趋势。这些结果表明高 mCRC 细胞 HCT116 更能促进 M2 型巨噬细胞极化。

### 2.2 高 mCRC 细胞诱导的 M2 型巨噬细胞对免疫逃逸的影响

收集相应的巨噬细胞 CM 刺激 HCT116 细胞, Western blot (图 2A,  $F = 24.03$ ,  $P < 0.01$ ) 和 qPCR (图 2B,  $F = 40.49$ ,  $P < 0.001$ ) 结果显示, 与 CM<sub>M0</sub> 组相比, CM<sub>SW480-M $\phi$</sub>  组和 CM<sub>HCT116-M $\phi$</sub>  组的

PD-L1 蛋白表达水平升高, 而 CM<sub>HCT116-M $\phi$</sub>  组表达水平最高。如图 2C, 与 T 淋巴细胞共培养后, 与其他两组相比, CM<sub>HCT116-M $\phi$</sub>  组 HCT116 细胞存活最多, 同时 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  水平最低 (图 2D,  $F_{TNF-\alpha} = 67.42$ ,  $F_{IFN-\gamma} = 45.81$ ,  $P < 0.001$ )。这些结果表明高 mCRC 细胞 HCT116 诱导的 M2 型巨噬细胞可以促进 HCT116 细胞表达 PD-L1, 从而促进免疫逃逸。

### 2.3 转移程度不同的 CRC 细胞表达 KLF4 的差异

Western blot 结果显示, 相比于 SW480 组, HCT116 组的 KLF4 蛋白水平更高 (图 3A,  $t = 4.627$ ,  $P < 0.01$ )。同时 qPCR (图 3B,  $t = 6.952$ ,  $P < 0.01$ ) 和 ELISA 实验 (图 3C,  $t = 7.84$ ,  $P < 0.01$ ) 也显示 HCT116 细胞的 KLF4 水平高于 SW480 细胞。这些结果表明高 mCRC 细胞 HCT116 高表达 KLF4。

### 2.4 高 mCRC 细胞通过分泌 KLF4 对 2 型巨噬细胞极化的影响

选择安全浓度 (5  $\mu$ mol/L) 的 KLF4 抑制剂预处理 HCT116 细胞 (图 4A)。流式实验结果显示 (图 4B), Ken 预处理 HCT116 细胞后, 与 HCT116-M $\phi$  组相比, (HCT116 + Ken)-M $\phi$  组的 M2 型巨噬细胞比例下降 ( $t = 7.662$ ,  $P < 0.01$ )。同时

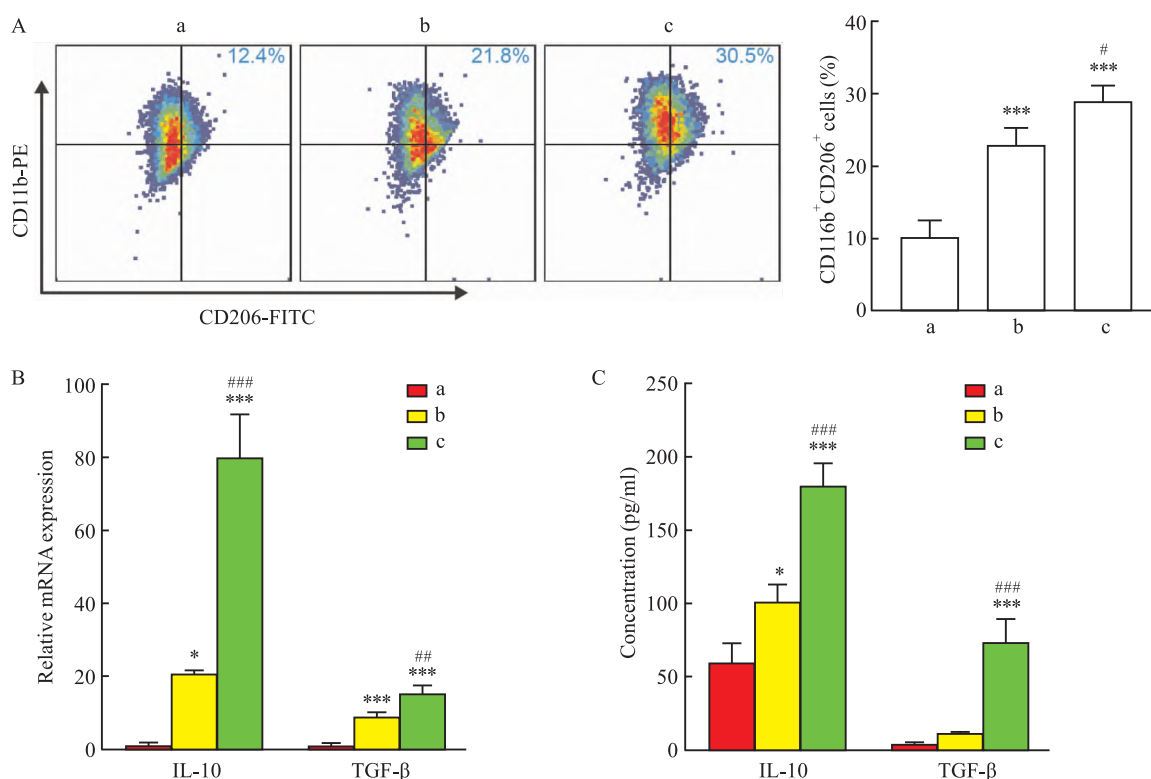


图 1 高 mCRC 细胞对 M2 型巨噬细胞极化的影响

Fig. 1 The effect of highly mCRC cells on M2 macrophage polarization

A: Flow cytometry results; B: qPCR results; C: ELISA results; a: M0 group; b: SW480-M $\phi$  group; c: HCT116-M $\phi$  group; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs M0 group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  vs SW480-M $\phi$  group.

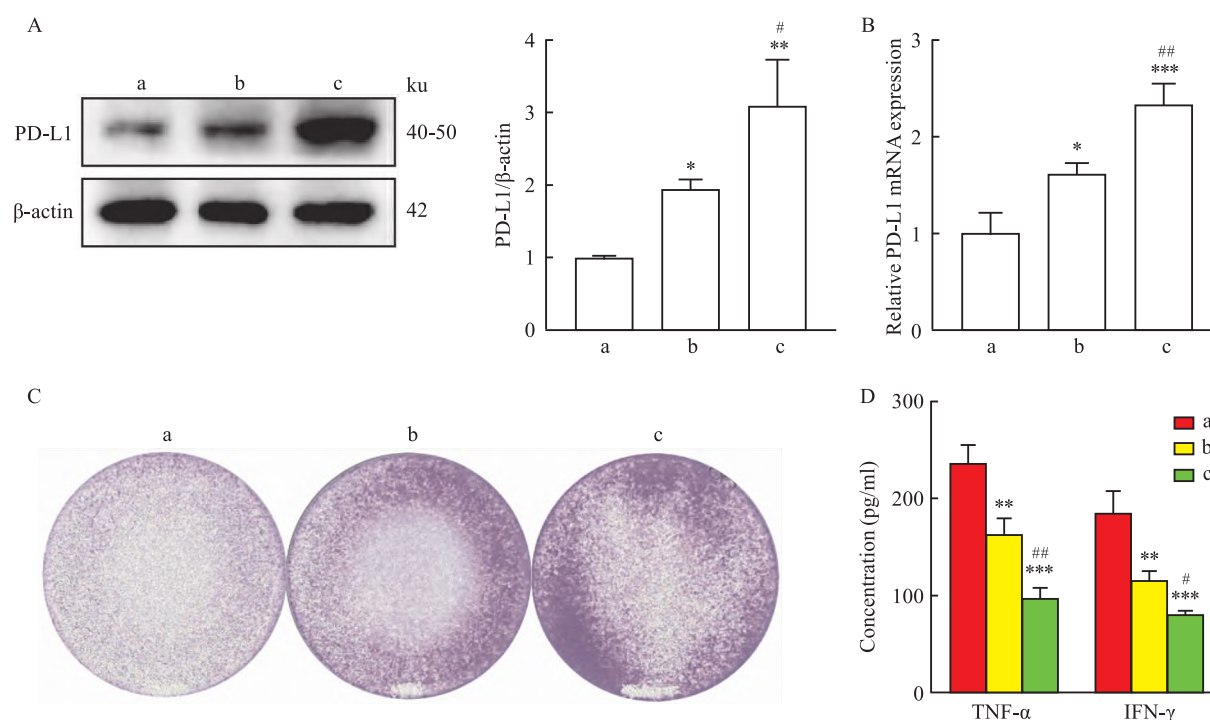


图2 高 mCRC 细胞诱导的 M2 型巨噬细胞对免疫逃逸的影响

Fig. 2 The effect of M2 macrophages induced by highly mCRC cells on immune escape

A: Western blot results; B: qPCR results; C: The co-culture results of HCT116 cells stimulated by CM with T cells; D: ELISA results; a:  $CM_{M0}$  group; b:  $CM_{SW480-M\phi}$  group; c:  $CM_{HCT116-M\phi}$  group; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs  $CM_{M0}$  group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs  $CM_{SW480-M\phi}$  group.

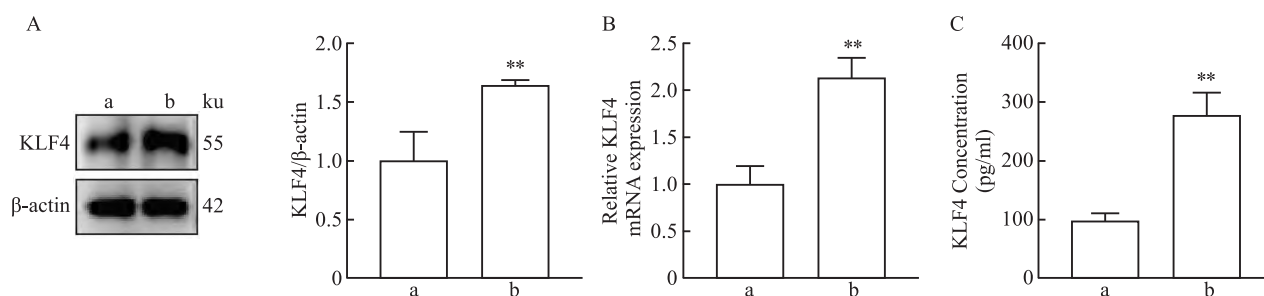


图3 转移程度不同的 CRC 细胞表达 KLF4 的差异

Fig. 3 Differences in KLF4 expression in CRC cells with different degrees of metastasis

A: Western blot results; B: qPCR results; C: ELISA results; a: SW480 group; b: HCT116 group; \*\*  $P < 0.01$  vs SW480 group.

qPCR (图 4C,  $t_{IL-10} = 3.474$ ,  $t_{TGF-\beta} = 3.123$ ,  $P < 0.05$ ) 和 ELISA 试验 (图 4D,  $t_{IL-10} = 4.916$ ,  $P < 0.01$ ;  $t_{TGF-\beta} = 3.037$ ,  $P < 0.05$ ) 检测表明 (HCT116 + Ken)-M $\phi$  组的 M2 型巨噬细胞标志物 (IL-10 和 TGF- $\beta$ ) 水平下降。以上结果表明高 mCRC 细胞通过分泌 KLF4 诱导 M2 型巨噬细胞极化。

**2.5 KLF4 抑制剂对 M2 型巨噬细胞介导的 PD-L1 表达的影响** 用  $CM_{HCT116-M\phi}$  和  $CM_{(HCT116+Ken)-M\phi}$  分别刺激 HCT116 细胞后, Western blot (图 5A,  $t = 3.001$ ,  $P < 0.05$ ) 和 qPCR (图 5B,  $t = 5.314$ ,  $P <$

0.01) 检测结果显示, 与  $CM_{HCT116-M\phi}$  组相比,  $CM_{(HCT116+Ken)-M\phi}$  组的 PD-L1 蛋白表达水平下降。结果表明 KLF4 在高 mCRC 细胞中通过诱导 M2 型巨噬细胞极化促进免疫逃逸中起了重要作用。

### 3 讨论

肿瘤免疫微环境不仅在肿瘤的发生与进展中起着重要作用<sup>[7]</sup>, 而且与免疫治疗反应和患者生存率密不可分<sup>[8]</sup>。TAMs 是肿瘤免疫微环境的重要组成部分, 由少量抗肿瘤的 M1 型巨噬细胞和大量促肿

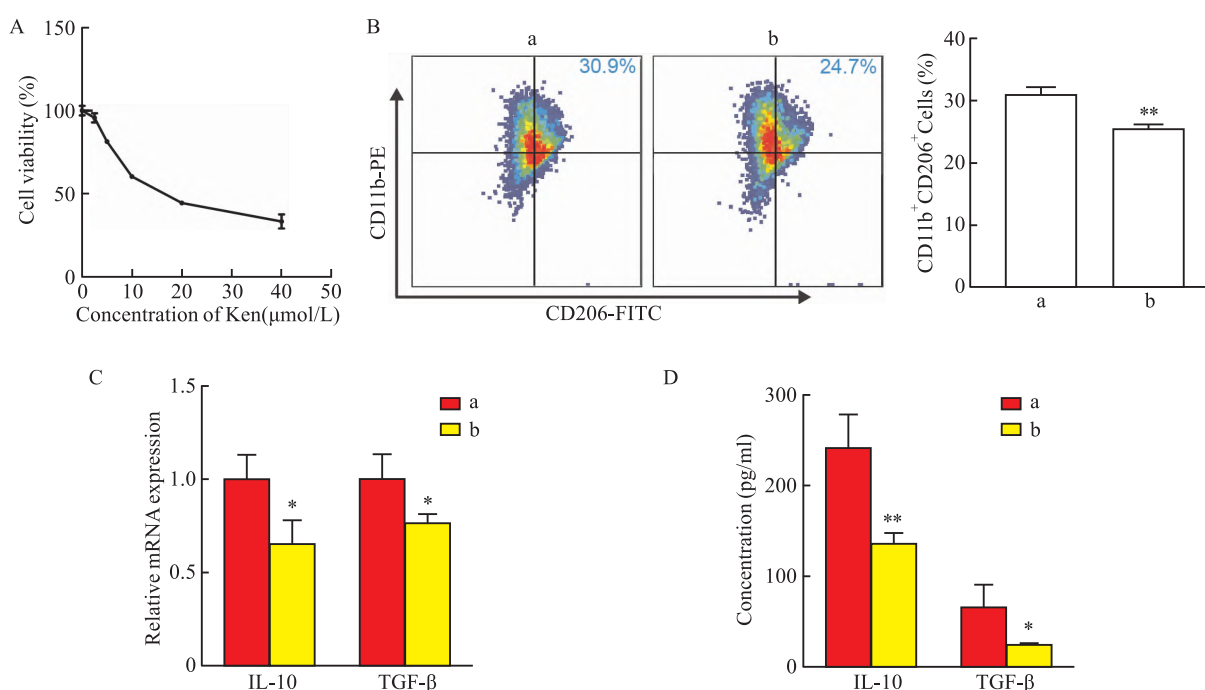


图4 高 mCRC 细胞通过分泌 KLF4 对 M2 型巨噬细胞极化的影响

Fig. 4 The effect of highly mCRC cells on M2 macrophage polarization through KLF4 secretion

A: Cytotoxicity of Ken on HCT116 cells detected by CCK-8 assay; B: Flow cytometry results; C: qPCR results; D: ELISA results; a: HCT116-Mφ group; b: (HCT116 + Ken)-Mφ group; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs HCT116-Mφ group.

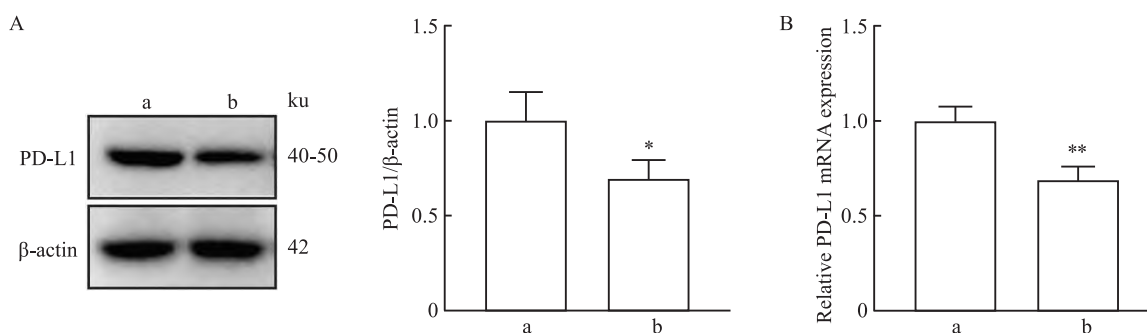


图5 KLF4 抑制剂对 M2 型巨噬细胞介导的 PD-L1 表达的影响

Fig. 5 The effect of KLF4 inhibitor on M2 macrophage-mediated PD-L1 expression

A: Western blot results; B: qPCR results; a: CM<sub>HCT116-Mφ</sub> group; b: CM<sub>(HCT116 + Ken)-Mφ</sub> group; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs CM<sub>HCT116-Mφ</sub> group.

瘤的 M2 型巨噬细胞共同构成,其中 M2 型巨噬细胞可促进肿瘤生长、血管生成、转移,并诱导免疫抑制状态微环境的形成,最终促进肿瘤的发展<sup>[8]</sup>。大量研究<sup>[8-9]</sup>表明,TAMs 浸润通常与肿瘤不良预后相关,并且被认为会降低放疗、化疗和靶向治疗的反应。本研究用高 mCRC 细胞 HCT116 和低 mCRC 细胞 SW480 上清液分别刺激 M0 巨噬细胞后,用流式细胞术检测显示 HCT116-Mφ 细胞中的 CD11b<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> 细胞比例明显高于 SW480-Mφ 细胞,qPCR 和 ELISA 实验显示 HCT116-Mφ 细胞中 IL-10 和 TGF-β 的水平明显高于 SW480-Mφ 细胞,表明高

mCRC 细胞 HCT116 更能促进 M2 型巨噬细胞极化。

免疫疗法因其可以激活患者自身免疫系统产生持久的抗肿瘤效应已被广泛用于治疗人类癌症,如针对免疫检查点的免疫疗法 PD-1/PD-L1。PD-L1 是 B7 家族细胞表面糖蛋白,也是维持免疫稳态的重要蛋白质,癌细胞上的 PD-L1 与免疫细胞上的 PD-1 结合,有助于癌症免疫逃逸<sup>[10-11]</sup>,阻断 PD-1/PD-L1 表达,则可以增强抗肿瘤免疫。研究<sup>[12]</sup>表明,肿瘤细胞 PD-L1 的表达水平可能影响 PD-1/PD-L1 阻断的临床反应。本研究中收集 M0、HCT116-Mφ 和 SW480-Mφ 细胞上清液刺激 HCT116 细胞后

进行的 Western blot 和 qPCR 实验表明,高转移结直肠癌细胞 HCT116 诱导的 M2 型巨噬细胞能显著促进 HCT116 细胞表达 PD-L1,同时,将刺激后的 HCT116 细胞与 T 淋巴细胞共培养,发现 T 淋巴细胞对肿瘤细胞的杀伤作用明显减弱,且 T 淋巴细胞分泌的 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  水平明显下降,因此,高 mCRC 细胞 HCT116 诱导的 M2 型巨噬细胞通过促进 HCT116 细胞表达 PD-L1,从而促进免疫逃逸。

文献<sup>[13-15]</sup>报道,KLF4 作为转录因子,在免疫抑制及肿瘤转移等方面发挥重要作用,且与 CRC 的不良预后相关。Leng et al<sup>[16]</sup>在结肠癌细胞中分离出具有干性特征的球状细胞,将 KLF4 敲低后,发现其迁移、侵袭、耐 5-FU 和增殖能力减弱,因此 KLF4 是诱导和维持结直肠癌肿瘤干性的关键因子。Arora et al<sup>[5]</sup>的研究表明 KLF4 具有调节非小细胞肺癌微环境中的 M2 型巨噬细胞的极化作用,其机制可能与调节基因 IL-1 $\beta$ 、IL-6 (促炎介质)的表达有关。为了探讨 KLF4 在高 mCRC 细胞诱导 M2 型巨噬细胞极化中的作用,该研究中首先用 Western blot、qPCR 和 ELISA 实验表明 KLF4 在高 mCRC 细胞 HCT116 中高表达。随后用 KLF4 抑制剂预处理 HCT116 后,通过流式试验、qPCR 和 ELISA 试验表明(HCT116 + Ken)-M $\phi$  细胞中 M2 型巨噬细胞比例明显下降,表明 KLF4 在高 mCRC 细胞诱导 M2 型巨噬细胞极化中起了关键作用。此外将 HCT116-M $\phi$  与(HCT116 + Ken)-M $\phi$  上清刺激 HCT116 细胞后,发现与 HCT116-M $\phi$  上清组相比,(HCT116 + Ken)-M $\phi$  上清组的 HCT116 细胞 PD-L1 表达下降,表明 KLF4 在高 mCRC 细胞中通过诱导 M2 型巨噬细胞极化促进免疫逃逸中起了重要作用。

综上所述,高 mCRC 细胞 HCT116 通过分泌 KLF4 诱导 M2 型巨噬细胞极化,极化后的 M2 型巨噬细胞又促进了结直肠细胞表达 PD-L1,促进肿瘤免疫逃逸,因此,KLF4 可能成为提高晚期 CRC 患者免疫治疗效果的潜在治疗靶点。但该研究仅进行了体外细胞验证,未来可进一步进行动物实验验证。

### 参考文献

- [1] Shin A E, Giancotti F G, Rustgi A K. Metastatic colorectal cancer: mechanisms and emerging therapeutics[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2023, 44(4): 222 - 36. doi: 10.1016/j.tips.2023.01.003.
- [2] Li J J, Wang J H, Tian T, et al. The liver microenvironment orchestrates FGL1-mediated immune escape and progression of metastatic colorectal cancer[J]. *Nat Commun*, 2023, 14: 6690. doi: 10.1038/s41467-023-42332-0.
- [3] Ghaleb A M, Yang V W. Krüppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know[J]. *Gene*, 2017, 611: 27 - 37. doi: 10.1016/j.gene.2017.02.025.
- [4] Zhou Q, Fan D, Huang K, et al. Activation of KLF4 expression by small activating RNA promotes migration and invasion in colorectal epithelial cells[J]. *Cell Biol Int*, 2018, 42(4): 495 - 503. doi: 10.1002/cbin.10926.
- [5] Arora S, Singh P, Ahmad S, et al. Comprehensive integrative analysis reveals the association of KLF4 with macrophage infiltration and polarization in lung cancer microenvironment[J]. *Cells*, 2021, 10(8): 2091. doi: 10.3390/cells10082091.
- [6] Tang D, Wang H, Deng W, et al. Mechanism of bufalin inhibition of colon cancer liver metastasis by regulating M2-type polarization of Kupffer cells induced by highly metastatic colon cancer cells[J]. *Apoptosis*, 2024, 29(5): 635 - 48. doi: 10.1007/s10495-023-01930-5.
- [7] Falcomatù C, Bärthel S, Schneider G, et al. Context-specific determinants of the immunosuppressive tumor microenvironment in pancreatic cancer[J]. *Cancer Discov*, 2023, 13(2): 278 - 97. doi: 10.1158/2159-8290.cd-22-0876.
- [8] Xiang X, Wang J, Lu D, et al. Targeting tumor-associated macrophages to synergize tumor immunotherapy[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6: 75. doi: 10.1038/s41392-021-00484-9.
- [9] 刘文辉, 洪文明, 陈佳星, 等. 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[J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(11): 1931 - 8. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.11.007.
- [9] Liu W H, Hong W M, Chen J X, et al. M2 macrophage-derived TNFSF13 affects temozolomide resistance in glioblastoma cells by activating IRF8[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(11): 1931 - 8. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.11.007.
- [10] Juneja V R, McGuire K A, Manguso R T, et al. PD-L1 on tumor cells is sufficient for immune evasion in immunogenic tumors and inhibits CD8 T cell cytotoxicity[J]. *J Exp Med*, 2017, 214(4): 895 - 904. doi: 10.1084/jem.20160801.
- [11] Pu Y, Ji Q. Tumor-associated macrophages regulate PD-1/PD-L1 immunosuppression[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 874589. doi: 10.3389/fimmu.2022.874589.
- [12] Ma X, Jia S, Wang G, et al. TRIM28 promotes the escape of gastric cancer cells from immune surveillance by increasing PD-L1 abundance[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8: 246. doi: 10.1038/s41392-023-01450-3.
- [13] Qi X T, Li Y L, Zhang Y Q, et al. KLF4 functions as an oncogene in promoting cancer stem cell-like characteristics in osteosarcoma cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40: 546 - 55. doi: 10.1038/s41401-018-0050-6.
- [14] Ou D L, Chen C W, Hsu C L, et al. Regorafenib enhances anti-tumor immunity via inhibition of p38 kinase/Creb1/Klf4 axis in tumor-associated macrophages[J]. *J Immunother Cancer*, 2021, 9(3): e001657. doi: 10.1136/jitc-2020-001657.



[15] Li W, Guo L, Tang W, et al. Identification of DNA methylation biomarkers for risk of liver metastasis in early-stage colorectal cancer[J]. *Clin Epigenetics*, 2021, 13(1): 126. doi:10.1186/s13148-021-01108-3.

[16] Leng Z, Tao K, Xia Q, et al. Krüppel-like factor 4 acts as an oncogene in colon cancer stem cell-enriched spheroid cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56082. doi: 10.1371/journal.pone.0056082.

## The effect of highly metastatic colorectal cancer cells on immune escape of colorectal cancer by secreting KLF4-induced M2 macrophages polarization

Shang Jing<sup>1,2</sup>, Lu Chang<sup>3</sup>, Hou Yangbo<sup>4</sup>, Yuan Qin<sup>3</sup>, Li Wei<sup>3</sup>, Wang Haijing<sup>5</sup>, Chen Jinbao<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Traditional Chinese Medicine Oncology, <sup>2</sup>Dept of Radiology, <sup>3</sup>Dept of General Surgery,

<sup>4</sup>Dept of Neurology, <sup>5</sup>Dept of Pharmacy, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062)

**Abstract Objective** To investigate the effect and mechanism of M2 macrophage polarization induced by HCT116 with highly metastatic colorectal cancer cells on immune escape in colorectal cancer. **Methods** After the co-culture of colorectal cancer cells conditioned medium (CM) and PMA-induced M0 macrophages, the polarization of M2 macrophages was observed by flow cytometry, real-time polymerase chain reaction (qPCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) experiments. The CM<sub>M0</sub>, CM<sub>SW480-Mφ</sub> and CM<sub>HCT116-Mφ</sub> were co-cultured with HCT116 cells, and the expression of programmed death-ligand 1 (PD-L1) was detected by Western blot and qPCR. At the same time, the stimulated HCT116 cells were co-cultured with human T lymphocytes to detect the survival of HCT116 cells and the levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interferon-γ (IFN-γ). The difference of krüppel-like factor 4 (KLF4) expression between SW480 and HCT116 cells was detected by Western blots, qPCR and ELISA. After pretreatment of HCT116 cells with KLF4 inhibitor Kenpaullone (Ken), the CM<sub>HCT116</sub> and CM<sub>HCT116+Ken</sub> were co-cultured with M0 macrophages and the polarization of M2 macrophages was observed by flow cytometry, qPCR and ELISA. The CM<sub>HCT116-Mφ</sub> and CM<sub>(HCT116+Ken)-Mφ</sub> was co-cultured with HCT116 cells, and the PD-L1 expression of HCT116 cells was detected by Western blot and qPCR. **Results** After the stimulation of M0 macrophages with CM, the proportion of CD11b<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> cells in HCT116-Mφ cells was higher, and the expression of M2 macrophage markers interleukin (IL-10) and transforming growth factor-β (TGF-β) were higher. Compared with the CM<sub>SW480-Mφ</sub> group, the PD-L1 protein expression level was higher in the CM<sub>HCT116-Mφ</sub> group. After co-culture with T lymphocytes, the cell survival rate are the most in CM<sub>HCT116-Mφ</sub> group, while the levels of TNF-α and IFN-γ were the lowest. After the addition of Ken, the polarization ratio and markers of M2 macrophages decreased. Compared with CM<sub>HCT116-Mφ</sub> group, the expression of PD-L1 in HCT116 cells of the CM<sub>(HCT116+Ken)-Mφ</sub> group decreased. **Conclusion** Highly metastatic colorectal cancer cells induce polarization of M2 macrophages by secreting KLF4, promote PD-L1 expression in colorectal cancer cells, facilitate tumor immune escape, and provide potential targets for clinical immunotherapy.

**Key words** highly metastatic colorectal cancer cells; KLF4; tumor-associated macrophages; immune escape; PD-L1

**Fund programs** Shanghai Rising-Star Program (Sailing Special Project) (No. 22YF1441400); Technology Innovation Project of Shanghai Putuo District Health System (No. ptkwws202409); Shanghai Sixth People's Hospital Joint Constructed Scientific Research Fund (No. 23-LY-03); "100 Talents Project" of Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (No. 2022-RCLH-03); Budgeted Project of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (No. 2021LK055); Key Discipline Plan of Shanghai Health System (No. 2024ZDXK0046)

**Corresponding authors** Chen Jinbao, E-mail: 1976988891@qq.com; Wang Haijing, E-mail: wanghj0307@163.com