

网络出版时间:2025-11-12 17:35:22 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20251202.1332.007

小白菊内酯通过调控 CCL2 介导肿瘤相关巨噬细胞表型极化抑制胆囊癌细胞恶性进展

李鸿晨,哈力木拉提·吾布力卡斯木,陈 骏

(新疆医科大学附属中医医院普外科,乌鲁木齐 830000)

摘要 目的 探究小白菊内酯(PTL)调节肿瘤相关巨噬细胞(TAM)极化抑制胆囊癌细胞恶性进展的作用及分子机制。方法 将 M0 型巨噬细胞与人胆囊癌细胞 GBC-SD 共培养,并加入 PTL 干预,分为对照组、TAM 组、TAM + PTL 组,流式细胞术检测巨噬细胞中 CD86 和 CD206 水平,RT-qPCR 和 Western blot 检测 CD163、白细胞介素-10(IL-10)和精氨酸酶-1(Arg-1)表达;ELISA 和 Western blot 检测 GBC-SD 细胞上清液中 CC 类趋化因子配体 2(CCL2)分泌量及细胞中 CCL2 表达。通过 CCL2 过表达载体转染 GBC-SD 细胞,分为 TAM 组、TAM + PTL 组、TAM + PTL + OE-NC 组、TAM + PTL + OE-CCL2 组,流式细胞术检测巨噬细胞中 CD86 和 CD206 水平,RT-qPCR 和 Western blot 检测 CD163、IL-10 和 Arg-1 表达;CCK-8 法、平板克隆形成、Transwell 小室实验分别检测 GBC-SD 细胞增殖、迁移与侵袭。结果 与 TAM 组比较,TAM + PTL 组巨噬细胞中 CD86 表达增加、CD206 表达减少,CD163、IL-10、Arg-1 mRNA 及蛋白表达量下调,GBC-SD 细胞中 CCL2 含量降低且 CCL2 蛋白表达量下调,细胞增殖活性及克隆形成数目、迁移与侵袭数目均减少($P < 0.05$);与 TAM + PTL 组比较,TAM + PTL + OE-CCL2 组巨噬细胞中 CD86 表达减少、CD206 表达增加,CD163、IL-10、Arg-1 mRNA 及蛋白表达量上调,细胞增殖活性升高,克隆形成数目、迁移与侵袭数目均增加($P < 0.05$)。结论 PTL 通过下调胆囊癌细胞中 CCL2 表达,进而抑制 TAM 中巨噬细胞向 M2 型极化,阻止胆囊癌细胞增殖、迁移及侵袭。

关键词 胆囊癌;小白菊内酯;肿瘤相关巨噬细胞;CC 类趋化因子配体 2;增殖;迁移;侵袭

中图分类号 R 735.8

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)12-2197-10

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.12.002

胆囊癌是源自胆囊上皮的恶性肿瘤,因早期症状不明显且进展迅速,多数患者确诊时已属晚期,常出现肝、肺及其他器官转移^[1-2]。手术切除是早期胆囊癌的有效疗法,但晚期患者多因远处转移失去手术机会,仅能接受化疗或放疗^[3]。目前以吉西他滨为基础的化疗常引起严重毒副作用和耐药性,患者 5 年生存率低于 25%^[4]。因此,亟需寻找新药物并探究其抗肿瘤机制以改善治疗效果。肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage, TAM)是肿瘤微环境的主要组成部分,可分为促炎的 M1 型和免疫抑制的 M2 型。M1 型能够增强抗肿瘤免疫反应, M2 型则促进肿瘤生长和转移^[5]。研究^[6-8]显示,胆囊癌微环境中的 TAM 状态倾向于 M2 型,可促进细胞增殖、迁移及侵袭,增强免疫抑制并促进肿瘤生

长。小白菊内酯(parthenolide, PTL)为菊科植物天然倍半萜内酯,具抗炎、抗氧化和抗肿瘤特性。PTL 对结直肠癌^[9]、胃癌^[10]、乳腺癌^[11]、甲状腺癌^[12]等多种肿瘤有抑制效果。研究^[13]表明,PTL 能够抑制胆囊癌细胞生长,通过抑制丝裂原活化蛋白激酶通路诱导细胞凋亡。然而其抗肿瘤机制及对 TAM 极化的影响尚需深入探讨。该研究通过探讨 PTL 对胆囊癌微环境中 TAM 极化的作用及分子机制,旨在为胆囊癌治疗提供新的靶点和潜在药物。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞与培养 人单核细胞系 THP-1 购于上海酶研生物科技有限公司,人胆囊癌细胞系 GBC-SD 购于武汉益普生物科技有限公司。THP-1 和 GBC-SD 细胞复苏后,添加含 1% 青-链霉素和 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,在条件为 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养细胞,2 d 换液 1 次,常规传代。

1.1.2 主要试剂 青-链霉素混合液(货号:AC03L332)购自上海和元李记生物技术有限公司,

2025-08-29 接收

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金青年项目(编号:2021D01C240)

作者简介:李鸿晨,男,主治医师;

陈 骏,男,副主任医师,通信作者,E-mail: chenjun1974@126.com

胎牛血清(货号:S8056-01)购自广州蕊特生物科技有限公司,RPMI-1640 培养液(货号:ZY-97077)购自美国 HyClone 公司,PTL(纯度 $\geq 98\%$,货号:WKQ-0000599)购自四川省维克奇生物科技有限公司,佛波酯(货号:P8139-1MG)购自美国 Sigma 公司,牛血清白蛋白(货号:BGT-CMP-101)购自武汉佰瑞得生物技术有限公司,Transwell 小室(货号:3422)购自美国 Corning 公司,TRIzol 法总 RNA 提取试剂盒(货号:RN0102)购自杭州昊鑫生物科技股份有限公司,ChamQ SYBR qPCR 试剂盒和 BCA 蛋白定量试剂盒(货号:Q341、E112-01)购自南京诺唯赞生物科技公司,RIPA 裂解液(货号:IN-WB001)购自北京英文特生物技术公司,化学发光显影试剂盒(货号:YIJI30026)购自上海一基实业有限公司,CC 类趋化因子配体 2(CC chemokine ligand 2,CCL2)(货号:E01632) ELISA 测定试剂盒购自上海瓦兰生物技术有限公司,Lipofectamine 2000 试剂盒(货号:11668019)购自美国 Thermo Fisher 公司,CCK-8 试剂盒和结晶紫染液(货号:C0037、C0121)购自上海碧云天生物技术股份公司,CD86、CD206、GAPDH、CD163、IL-10、Arg-1、CCL2 的抗体(货号:ab239075、ab64693、ab8245、ab189915、ab310329、ab316434、ab255372)均购自英国 Abcam 公司,pCMV-SPORT6-CCL2 质粒和阴性对照 pCMV-SPORT6-NC 质粒购自武汉森灵生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器 流式细胞仪(型号:BD FACS-Canto II)购自美国 BD Biosciences 公司,实时荧光定量 PCR 系统(型号:ABI 7500)购自美国 Applied Biosystems 公司,显微镜(型号:CX31)购自日本 Olympus 公司,酶标仪(型号:SK-2100)购自北京神康医用科技有限公司,细胞培养箱(型号:PHCB-250D)购自上海培康生物仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 共培养体系构建 利用 Transwell 小室构建胆囊癌细胞与巨噬细胞共培养体系,将浓度为 1×10^5 个/mL 的 THP-1 细胞接种到 6 孔 Transwell 的上层小室,加入 100 ng/mL 佛波酯培养 48 h,诱导为 M0 型巨噬细胞;取浓度为 1×10^5 个/mL 的 GBC-SD 细胞接种于新的 6 孔板底部,将诱导后的 M0 型巨噬细胞上室转移至接种了 GBC-SD 细胞的 6 孔板内,上下层以 0.4 μm 聚碳酸酯膜相隔,48 h 后停止培养,记为 TAM 组。以底部只加培养基无 GBC-SD 细胞作为对照组,以底部加入 15 $\mu\text{mol/L}$ PTL 处理的 GBC-SD 细胞作为 TAM + PTL 组。

1.2.2 流式细胞术 收集共培养后的巨噬细胞,用磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline,PBS)洗涤,加入 100 μL 含 2% 牛血清白蛋白的 PBS 重悬细胞,再分别加入 10 μL 藻红蛋白(phycoerythrin,PE)标记的抗 CD86 抗体和 10 μL PE 标记的抗 CD206 抗体,置于冰上避光孵育 30 min,孵育结束后,通过流式细胞仪检测各组细胞表面 CD86 和 CD206 表达水平。

1.2.3 RT-qPCR 实验 在收集的细胞中加入 TRIzol 溶液,提取总 RNA,检测 RNA 完整性和浓度。按照逆转录说明书步骤将 RNA 逆转录为 cDNA,根据 ChamQ SYBR qPCR 试剂盒进行 qPCR 反应,按说明书实验操作步骤,在无酶离心管内加入各试剂、引物、cDNA,并用无酶水补足 20 μL ,按下列条件进行扩增反应:95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,1 个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,40 个循环。使用仪器默认溶解曲线采集程序,以 GAPDH 作为内参将各目的基因的表达水平归一化,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行数据分析。Primer 5.0 软件设计引物,具体序列见表 1。

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

Gene	Primer sequence (5'-3')
CD163	F: GATGTCACCGGAGTTGTGC R: TGCAGTGTGTTATCCCTGCT
IL-10	F: CCAAGACCCAGACATCAAGG R: AAGGCATTCCTTCACCTGCTC
Arg-1	F: CACACCAGCTACTGGCACACC R: GCAACTGCTGTGTTCCTGTTCC
CCL2	F: TGTGCGCTGCTGCTCATAG R: GTTTGGGTTTGCTTGCTCC
GAPDH	F: AGAAGGCTGGGGCTCATTTG R: AGGGGCCATCCACAGTCTTC

1.2.4 Western blot 实验 各组细胞用 PBS 洗涤后,加入 RIPA 溶液提取总蛋白,BCA 法测定浓度。在蛋白中加入适量缓冲液,混匀后加热变性,取各组 40 μg 蛋白加载至聚丙烯酰胺凝胶孔内,电泳分离,电转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h。分别加入兔抗 CD163(1:1 000)、IL-10(1:1 000)、Arg-1(1:500)、CCL2(1:1 000)抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,TBST 洗膜后,加入对应二抗(1:5 000),室温反应 2 h。化学发光试剂显影,应用 ImageJ 软件分析各组条带的灰度值,以 GAPDH 作内参量化各目的蛋白的表达水平。

1.2.5 ELISA 实验 收集各组 GBC-SD 细胞培养物,4 $^{\circ}\text{C}$ 低温 4 000 r/min 离心 10 min,获取离心上

清液。使用 ELISA 试剂盒检测各组肿瘤细胞上清液中 CCL2 水平,制作标准曲线,在酶标仪上测量 450 nm 处的吸光度(optical density, OD)。

1.2.6 细胞转染与分组处理 将 GBC-SD 细胞以 1×10^5 个/mL 的浓度接种至 12 孔板,达到 80% 融合度时进行转染,利用 Lipofectamine 2000 分别将 pCMV-SPORT6-CCL2、pCMV-SPORT6-NC 转染至 GBC-SD 细胞,在 1.5 μ g 质粒中加入 250 μ L Opti-MEM 培养基,混匀静置 10 min,在 10 μ L 脂质体试剂中加入 250 μ L Opti-MEM 培养基,混匀静置 10 min,再将两种溶液混合作为转染体系加入到细胞孔内,转染 6 h 后更换为无抗生素的完全培养基,利用 Geneticin 培养基筛选稳转的细胞系。按“1.2.1”方法建立共培养体系,上层均为诱导后的 M0 型巨噬细胞,底部为不同处理的 GBC-SD 细胞,具体分组与处理如下:① TAM 组,底部为 GBC-SD 细胞;② TAM + PTL 组,底部为 15 μ mol/L PTL 处理的 GBC-SD 细胞;③ TAM + PTL + OE-NC 组,底部为转染 pCMV-SPORT6-NC 的 GBC-SD 细胞,并加入 15 μ mol/L PTL 处理;④ TAM + PTL + OE-CCL2 组,底部为转染 pCMV-SPORT6-CCL2 的 GBC-SD 细胞,并加入 15 μ mol/L PTL 处理。结束后,收集各组巨噬细胞检测极化情况并检测各组 GBC-SD 细胞行为学变化,并以单独培养、未进行任何处理的 GBC-SD 细胞作为对照组。

1.2.7 CCK-8 实验 将 GBC-SD 细胞按“1.2.6”方法进行分组与对应处理,置于培养箱中分别在培养 0、24、48、72 h 时,向每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,孵育 2 h 后,在酶标仪上测量各孔 OD 值,检测波长为 450 nm,制作各组细胞增殖曲线。

1.2.8 平板克隆形成实验 收集未处理和处理后的各组 GBC-SD 细胞,常规消化并制成细胞悬液,按照每孔 500 个细胞的密度接种在 6 孔板,置于培养箱中培养,14 d 形成肉眼可见克隆菌落,4% 多聚甲醛固定 20 min,0.1% 结晶紫染色 8 min,流水冲洗,在光学显微镜下拍照,随机取 6 个视野计数克隆数目,结果取均值。

1.2.9 Transwell 小室实验 采用孔径为 8 μ m 的 24 孔 Transwell 小室进行迁移和侵袭实验。侵袭实验前在每个小室中铺 100 μ L 基质胶,待胶凝固后再加细胞。将未处理和处理后的各组 GBC-SD 细胞进行消化后,用无血清培养基重悬并调整浓度为 3×10^5 个/mL,上层小室加入 200 μ L 细胞悬液,下层小

室加入 600 μ L 完全培养基,置于培养箱中孵育 48 h,吸干上室液体,4% 多聚甲醛固定 20 min,0.1% 结晶紫中染色 10 min,用棉签擦去小室内部细胞,在光学显微镜下拍照,随机取 6 个视野计数迁移或侵袭数目,结果取均值。

1.3 统计学处理 所有实验重复 6 次,每次实验设置 3 个生物学重复。采用 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计学分析并制作柱形图和曲线图,所有实验数据表示为 $\bar{x} \pm s$,采用单因素方差分析进行多组间数据差异比较,采用 LSD-*t* 检验进行组内两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PTL 对胆囊癌 TAM 极化的影响 将 GBC-SD 细胞、PTL 处理的 GBC-SD 细胞分别与巨噬细胞共培养后,流式细胞术检测结果显示,与对照组比较,TAM 组 M1 型巨噬细胞表面标志物 CD86 表达减少($P < 0.05$),M2 型巨噬细胞表面标志物 CD206 表达增加($P < 0.05$);与 TAM 组比较,TAM + PTL 组 M1 型巨噬细胞表面标志物 CD86 表达增加($P < 0.05$),M2 型巨噬细胞表面标志物 CD206 表达减少($P < 0.05$)。见图 1。

RT-qPCR 和 Western blot 检测结果显示,与对照组比较,TAM 组 M2 型巨噬细胞极化特征基因 CD163、IL-10、Arg-1 mRNA 及蛋白表达量上调($P < 0.05$);与 TAM 组比较,TAM + PTL 组中 CD163、IL-10、Arg-1 mRNA 及蛋白表达量下调($P < 0.05$)。见图 2。

2.2 PTL 对胆囊癌细胞 CCL2 分泌水平的影响 将 GBC-SD 细胞、PTL 处理的 GBC-SD 细胞分别与巨噬细胞共培养后,ELISA 检测结果显示,与对照组比较,TAM 组 GBC-SD 细胞培养上清液中 CCL2 含量升高($P < 0.05$);与 TAM 组比较,TAM + PTL 组 GBC-SD 细胞培养上清液中 CCL2 含量降低($P < 0.05$)。见图 3A。此外,TAM 组 GBC-SD 细胞中 CCL2 蛋白表达量高于对照组($P < 0.05$);TAM + PTL 组 GBC-SD 细胞中 CCL2 蛋白表达量低于 TAM 组($P < 0.05$)。见图 3B。

2.3 上调 CCL2 对 PTL 抑制 TAM 向 M2 型极化的影响 与未转染、转染 OE-NC 的 GBC-SD 细胞比较,转染 OE-CCL2 的 GBC-SD 细胞中 CCL2 mRNA 及蛋白表达量上调($P < 0.05$),表明在 GBC-SD 细胞中成功上调了 CCL2 表达。见图 4。

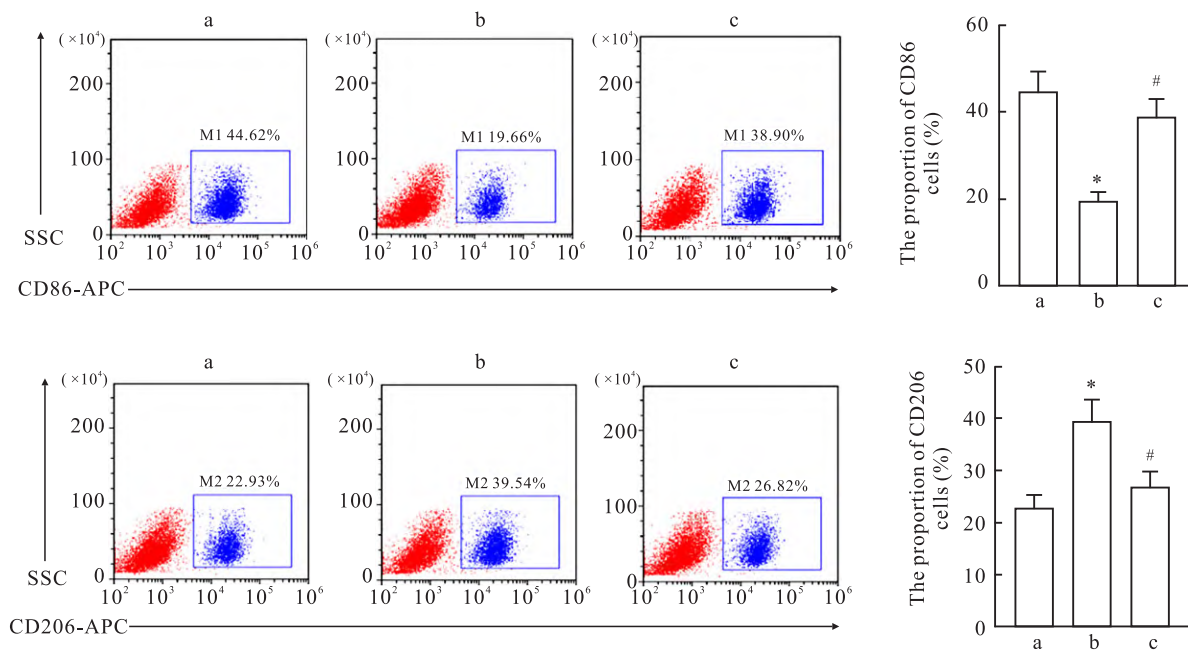


图1 流式细胞术检测 M1/M2 型巨噬细胞表面标志物表达

Fig.1 Flow cytometry detection of the expression of surface markers of M1/M2 macrophages

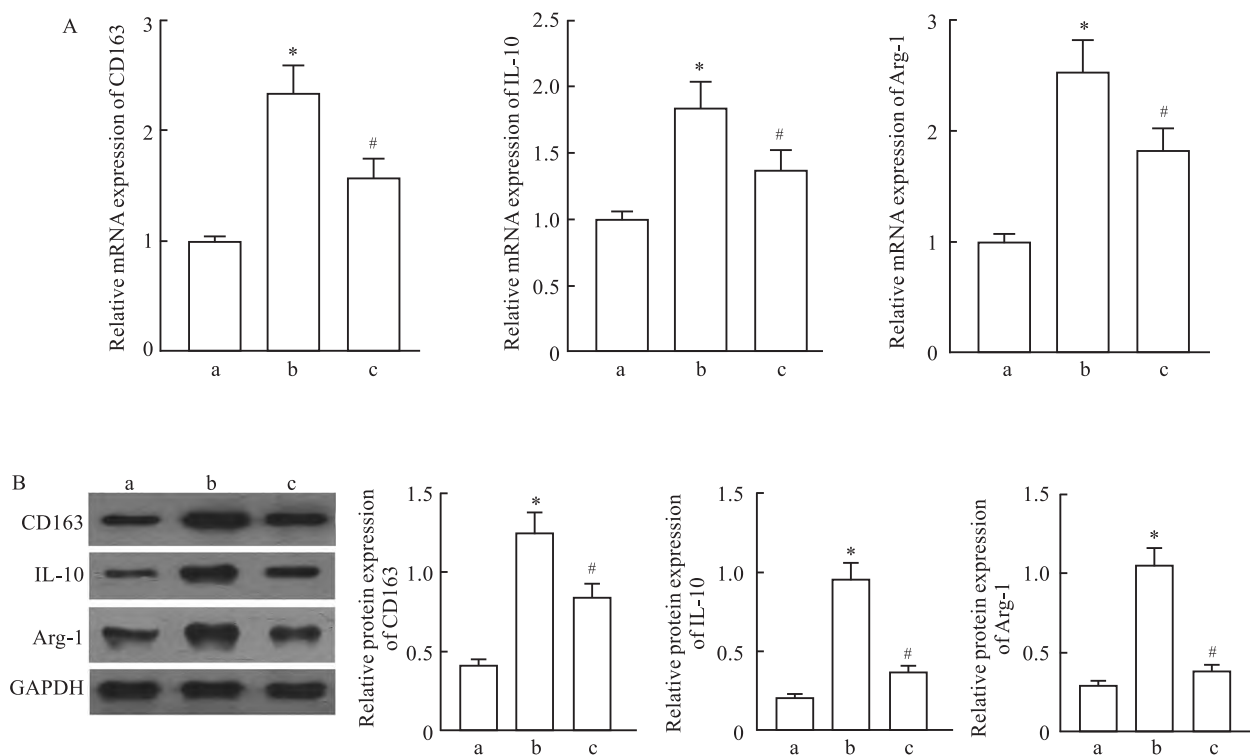
a: Control group; b: TAM group; c: TAM + PTL group; * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs TAM group.

图2 M2 型巨噬细胞极化特征基因 CD163、IL-10 和 Arg-1 表达

Fig.2 The expression of characteristic genes CD163, IL-10 and Arg-1 in M2 macrophage polarization

A: RT-qPCR was used to detect the mRNA expression of CD163, IL-10 and Arg-1; B: Western blot detection of CD163, IL-10 and Arg-1 protein expression; a: Control group; b: TAM group; c: TAM + PTL group; * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs TAM group.

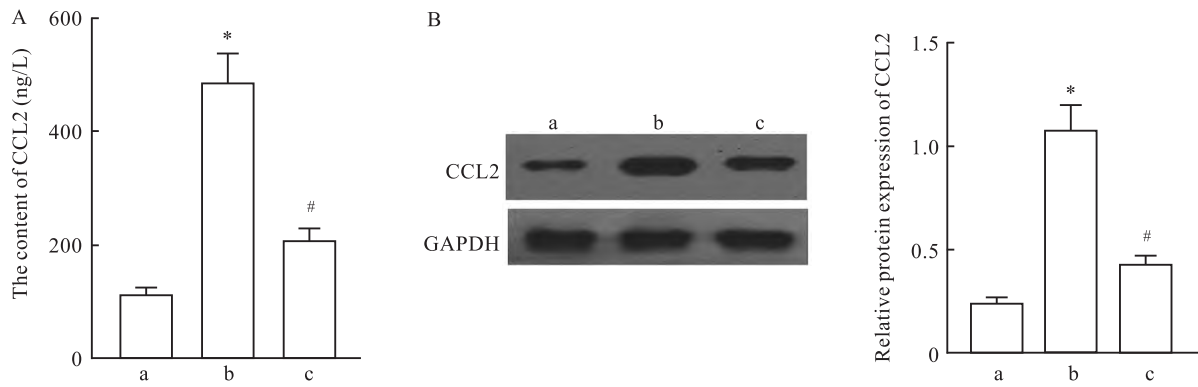


图3 各组胆囊癌细胞 CCL2 分泌与表达

Fig.3 CCL2 secretion and expression in gallbladder cancer cells in each group

A: ELISA was used to measure CCL2 secretion; B: Western blot was used to detect CCL2 protein expression; a: control group; b: TAM group; c: TAM + PTL group; * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs TAM group.

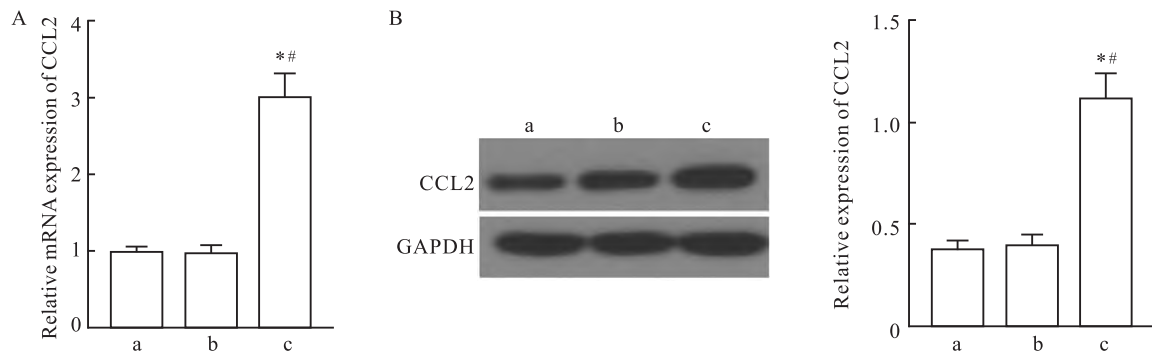


图4 转染后胆囊癌细胞中 CCL2 表达

Fig.4 CCL2 expression in transfected gallbladder cancer cells

A: RT-qPCR was used to detect the mRNA CCL2; B: Western blot was used to detect the protein CCL2; a: GBC-SD cells without transfection; b: GBC-SD cells transfected with OE-NC; c: GBC-SD cells transfected with OE-CCL2; * $P < 0.05$ vs GBC-SD cells without transfection; # $P < 0.05$ vs GBC-SD cells transfected with OE-NC.

流式细胞术检测结果显示,与 TAM + PTL 组比较,TAM + PTL + OE-CCL2 组 M1 型巨噬细胞表面标志物 CD86 表达减少($P < 0.05$),M2 型巨噬细胞表面标志物 CD206 表达增加($P < 0.05$),TAM + PTL + OE-NC 组中 CD86、CD206 未发生显著变化($P > 0.05$)。见图 5。

RT-qPCR 和 Western blot 检测结果显示,与 TAM + PTL 组比较,TAM + PTL + OE-CCL2 组 M2 型巨噬细胞极化特征基因 CD163、IL-10、Arg-1 mRNA 及蛋白表达量上调($P < 0.05$),TAM + PTL + OE-NC 组中 CD163、IL-10、Arg-1 mRNA 及蛋白表达量未发生显著变化($P > 0.05$)。见图 6。

2.4 PTL 通过 CCL-2 抑制 TAM 向 M2 型极化对胆囊癌细胞行为的影响 CCK-8 检测结果显示,在同一时间点(24、48、72 h)下,与 TAM 组比较,TAM + PTL 组 GBC-SD 细胞增殖活性降低($P <$

0.05);与 TAM + PTL 组比较,TAM + PTL + OE-CCL2 组 GBC-SD 细胞增殖活性升高($P < 0.05$),TAM + PTL + OE-NC 组增殖活性无显著变化($P > 0.05$)。见图 7。

平板克隆实验检测结果显示,与 TAM 组比较,TAM + PTL 组 GBC-SD 细胞克隆形成数目减少($P < 0.05$);与 TAM + PTL 组比较,TAM + PTL + OE-CCL2 组 GBC-SD 细胞克隆形成数目增加($P < 0.05$),TAM + PTL + OE-NC 组克隆形成数目无显著变化($P > 0.05$)。见图 8。

Transwell 小室实验检测结果显示,与 TAM 组比较,TAM + PTL 组 GBC-SD 细胞迁移、侵袭数目减少($P < 0.05$);与 TAM + PTL 组比较,TAM + PTL + OE-CCL2 组 GBC-SD 细胞迁移、侵袭数目增加($P < 0.05$),TAM + PTL + OE-NC 组迁移、侵袭数目均无显著变化($P > 0.05$)。见图 9。

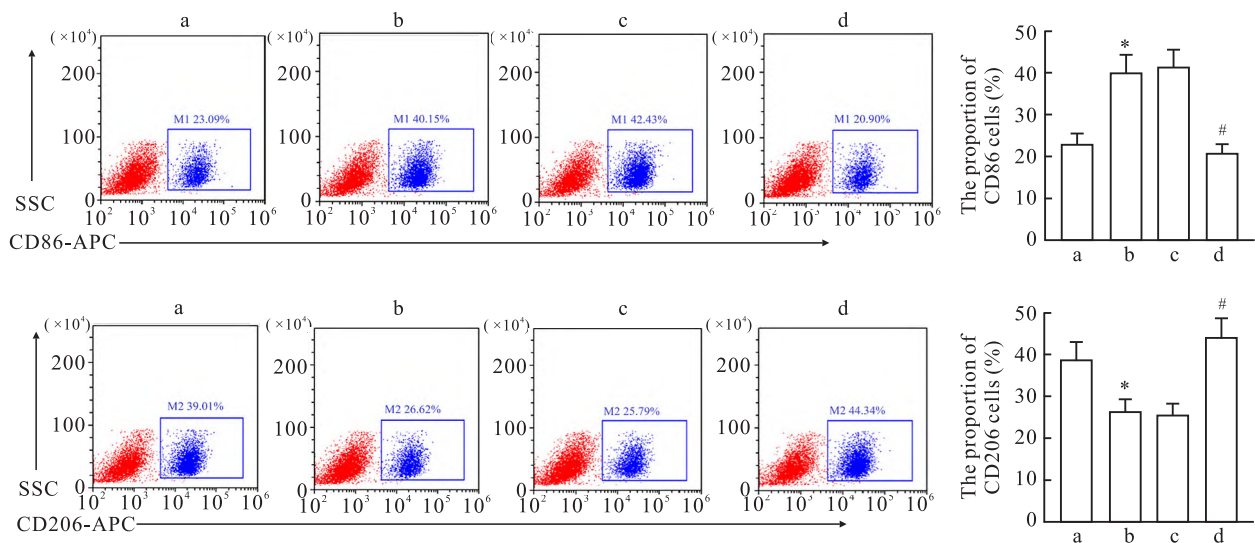


图5 流式细胞术检测 M1/M2 型巨噬细胞表面标志物表达

Fig. 5 Flow cytometry detection of M1/M2 macrophage surface marker expression

a: TAM group; b: TAM + PTL group; c: TAM + PTL + OE-NC group; d: TAM + PTL + OE-CCL2 group; * $P < 0.05$ vs TAM group; # $P < 0.05$ vs TAM + PTL group.

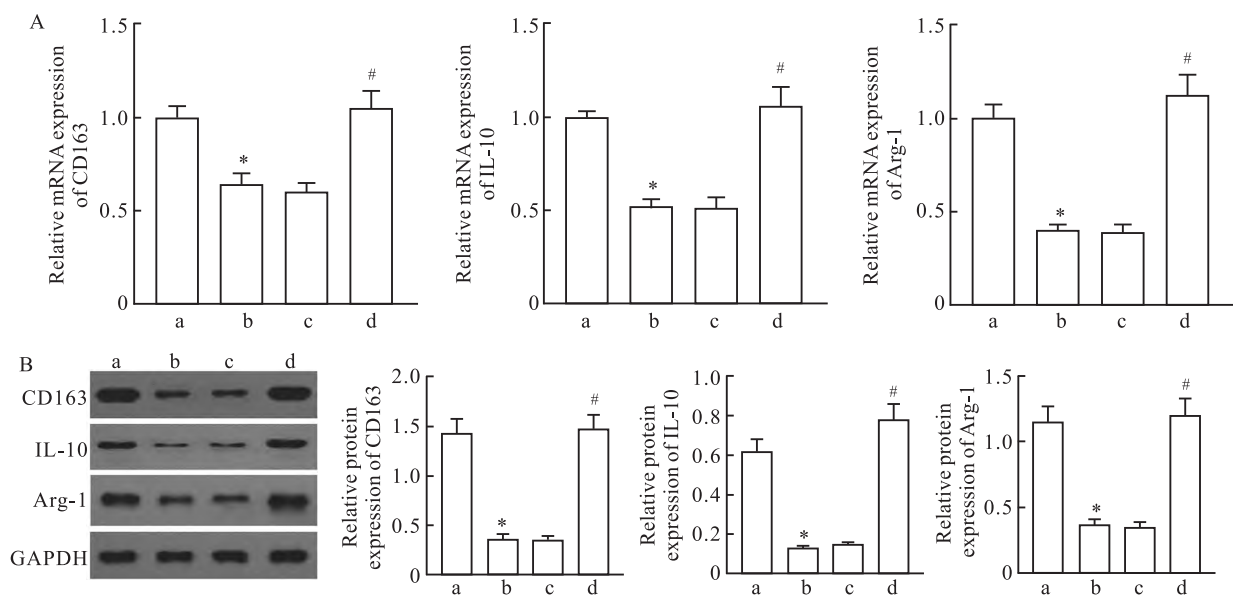


图6 M2 型巨噬细胞极化特征基因 CD163、IL-10 和 Arg-1 表达

Fig. 6 The expression of characteristic genes CD163, IL-10 and Arg-1 in M2 macrophage polarization

A: RT-qPCR was used to detect CD163, IL-10 and Arg-1 mRNA expression; B: Western blot detection of CD163, IL-10 and Arg-1 protein expression; a: TAM group; b: TAM + PTL group; c: TAM + PTL + OE-NC group; d: TAM + PTL + OE-CCL2 group; * $P < 0.05$ vs TAM group; # $P < 0.05$ vs TAM + PTL group.

3 讨论

肿瘤微环境是肿瘤形成和发展过程中一个复杂而关键的调控系统,由血管、肿瘤细胞、免疫细胞及细胞外基质等多种成分组成。肿瘤微环境不仅为肿

瘤细胞提供生存和增殖的支持,也通过多种信号传导机制促进肿瘤的侵袭与转移^[14]。其中,TAM 是肿瘤微环境中最丰富的免疫细胞类型之一,通常表达 M2 型巨噬细胞标志物和细胞因子,如 CD206、CD163、IL-10 和 Arg-1,支持肿瘤生长与扩散^[15]。研

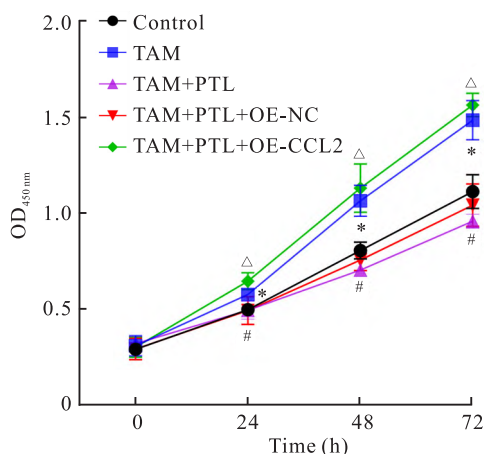


图7 CCK-8 检测各组胆囊癌细胞增殖活性

Fig. 7 CCK-8 detection of the proliferation activity of gallbladder cancer cells in each group

* $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs TAM group; $\Delta P < 0.05$ vs TAM + PTL group.

究^[16]表明,胆囊癌微环境中 TAM 的高密度与肿瘤恶性程度呈正相关,且高水平的 TAM 浸润与患者总生存期的缩短相关联。TAM 还可以通过抑制免疫系统的反应来帮助肿瘤逃逸宿主免疫监视,并分泌抗炎因子和趋化因子,对胆囊癌的发展产生直接影响^[17]。因此,靶向抑制 TAM 向 M2 型极化是抑制胆囊癌肿瘤生长的有效策略。

近年来,中草药因其多靶点、低毒副作用的特点

在肿瘤治疗中引起广泛关注。PTL 通过多种信号通路抑制肿瘤细胞的增殖与转移。例如,PTL 通过抑制溶质载体家族蛋白 25 成员 A1 表达导致线粒体功能障碍,从而抑制肝癌细胞的生长和干细胞特性^[18];PTL 通过抑制表皮生长因子介导的粘着斑激酶和糖原合酶激酶-3 β 的磷酸化来抑制宫颈癌细胞的增殖和迁移^[19]。此外,PTL 在免疫调节中的作用日益受到重视,相关研究报道指出 PTL 能调控巨噬细胞的功能,参与免疫治疗^[20],并通过调节肿瘤微环境中的免疫细胞发挥抗乳腺癌作用^[21]。但 PTL 对胆囊癌微环境中 TAM 极化及其分子机制尚缺乏系统研究。本研究通过构建胆囊癌 GBC-SD 细胞与 THP-1 细胞来源 M0 型巨噬细胞的共培养体系,在体外模拟胆囊癌微环境,结果显示,未经 PTL 处理的共培养组中,巨噬细胞表现出明显的 M2 型极化特征,M2 标志物 CD206、CD163、IL-10 和 Arg-1 表达均显著升高,而 M1 标志物 CD86 表达减少,提示肿瘤细胞促进 TAM 向免疫抑制的 M2 型转化,同时,GBC-SD 细胞表现出较高的增殖、迁移及侵袭能力。相较之下,PTL 处理组巨噬细胞中 M1 标志物表达增加,M2 标志物明显减少,CD163、IL-10、Arg-1 表达降低,且伴随胆囊癌细胞增殖和转移能力的显著抑制。上述结果提示,PTL 能够抑制胆囊癌微环境中 TAM 向 M2 型极化,抑制胆囊癌细胞恶性进展。

在肿瘤微环境中,TAM与肿瘤细胞通过多种信

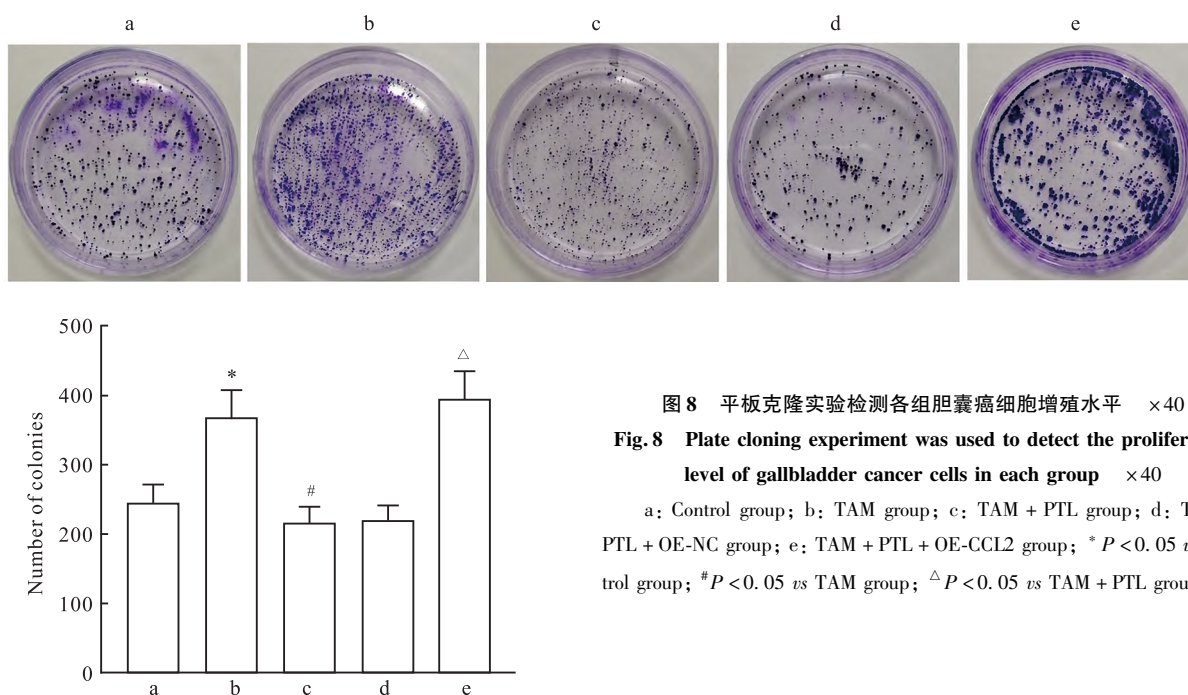


图8 平板克隆实验检测各组胆囊癌细胞增殖水平 ×40

Fig. 8 Plate cloning experiment was used to detect the proliferation level of gallbladder cancer cells in each group ×40

a: Control group; b: TAM group; c: TAM + PTL group; d: TAM + PTL + OE-NC group; e: TAM + PTL + OE-CCL2 group; * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs TAM group; $\Delta P < 0.05$ vs TAM + PTL group.

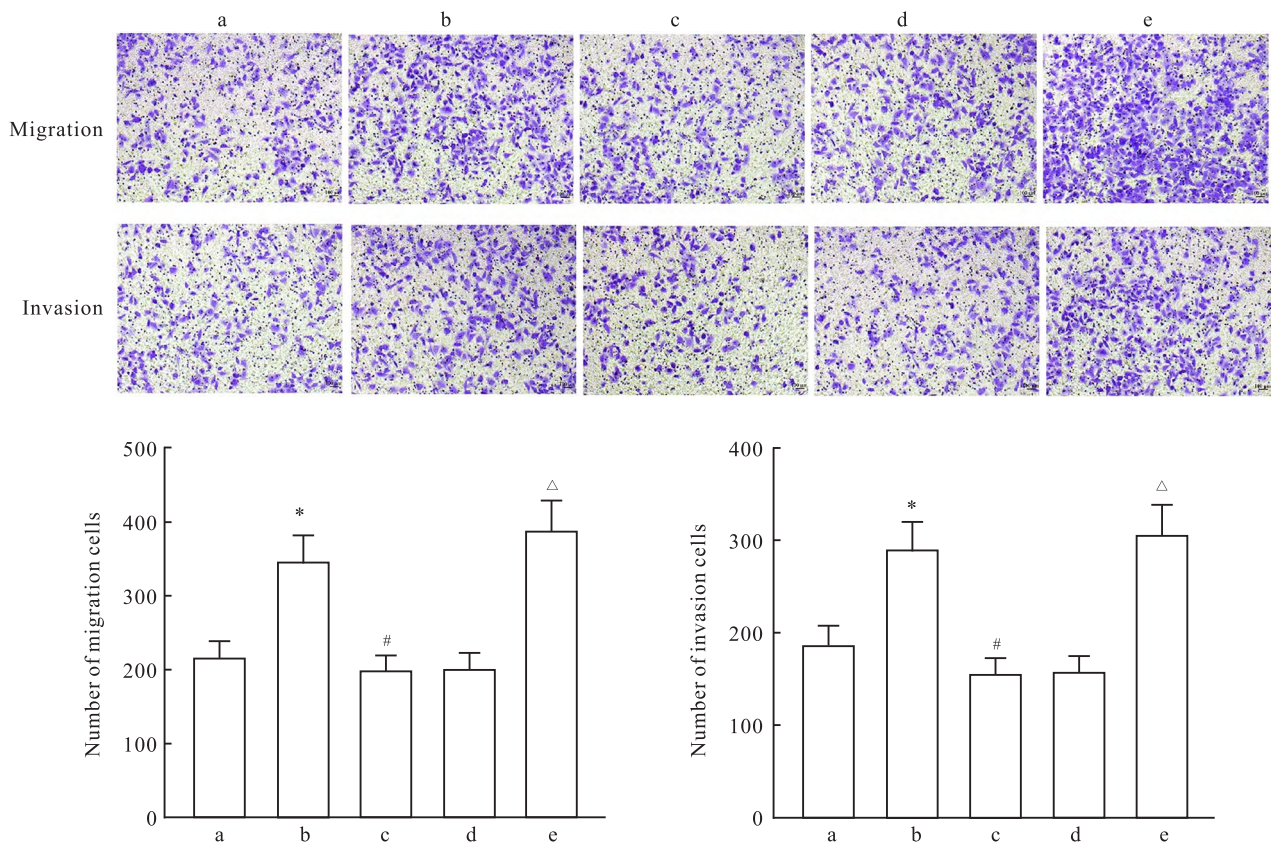


图9 Transwell 小室实验检测各组胆囊癌细胞迁移与侵袭 $\times 100$

Fig. 9 Transwell chamber assay was used to detect the migration and invasion of gallbladder cancer cells in each group $\times 100$

a: Control group; b: TAM group; c: TAM + PTL group; d: TAM + PTL + OE-NC group; e: TAM + PTL + OE-CCL2 group; * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs TAM group; Δ $P < 0.05$ vs TAM + PTL group.

号分子相互作用,形成促进肿瘤进展的正反馈环路。研究^[22]表明,肿瘤细胞通过分泌多种因子来诱导 TAM 形成并将其招募到肿瘤部位。CCL2 在 TAM 的募集及极化过程中发挥关键作用,其通过与受体 CCR2 结合,促进巨噬细胞迁移并诱导其向 M2 型转化,从而建立免疫抑制微环境,支持肿瘤生长和转移^[23-24]。肿瘤细胞通过调节 CCL2 表达,影响 TAM 的动态平衡,改变肿瘤免疫环境。例如,高迁移率蛋白 A2 直接结合转录激活因子 3 以激活其转录,诱导结直肠癌细胞分泌 CCL2,从而促进 TAM 募集并向 M2 型极化^[25];SLFN11 敲除的肝癌细胞中 CCL2 表达增加,这促进了巨噬细胞迁移和向 M2 型极化,减弱了抗 PD-1 免疫治疗效果^[26]。本研究结果显示,共培养后的 GBC-SD 细胞上清液中 CCL2 含量升高,细胞中 CCL2 蛋白表达量上调;而经 PTL 处理显著降低了细胞上清液中 CCL2 含量及 CCL2 蛋白表达,因而推测,PTL 可能通过抑制 CCL2 调控胆囊癌微环境中 TAM 极化。进一步过表达 CCL2

实验验证了 CCL2 在 PTL 调节 TAM 极化中的关键作用,实验结果显示,过表达 CCL2 后的巨噬细胞中 CD86 表达减少、CD206 表达增加,CD163、IL-10、Arg-1 表达上调,且 GBC-SD 细胞增殖活性升高,克隆形成数目、迁移及侵袭数目增加。以上结果证实了 CCL2 是 PTL 抑制 TAM 向 M2 型极化的作用靶点。

综上所述,PTL 通过抑制 CCL2 表达来阻止胆囊癌微环境中 TAM 向 M2 型极化,从而抑制胆囊癌细胞增殖、迁移及侵袭,控制胆囊癌的恶性进展,本研究结果有望为胆囊癌的潜在药物治疗提供理论支持。但此次研究实验结果需要在动物水平上进行体内验证,PTL 是否还通过调控其他因子来发挥作用,也尚需进一步明确。

参考文献

- [1] Wang S, Zheng R, Li J, et al. Global, regional, and national lifetime risks of developing and dying from gastrointestinal cancers in 185 countries: a population-based systematic analysis of GLOBO-

- CAN[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2024, 9(3): 229–37. doi: 10.1016/s2468-1253(23)00366-7.
- [2] Li Y, Song Y, Zhang Y, et al. Progress in gallbladder cancer with lymph node metastasis[J]. Front Oncol, 2022, 12: 966835. doi: 10.3389/fonc.2022.966835.
- [3] Waller G C, Sarpel U. Gallbladder cancer[J]. Surg Clin N Am, 2024, 104(6): 1263–80. doi: 10.1016/j.suc.2024.03.006.
- [4] Paluri R K, Haris H, Li P, et al. Role of chemoradiation in gallbladder cancer-a single institution retrospective analysis [J]. J Gastrointest Oncol, 2023, 14(5): 2212–20. doi: 10.21037/jgo-23-186.
- [5] Chu X, Tian Y, Lv C. Decoding the spatiotemporal heterogeneity of tumor-associated macrophages[J]. Mol Cancer, 2024, 23(1): 150. doi: 10.1186/s12943-024-02064-1.
- [6] Wang Z, Wang S, Jia Z, et al. YKL-40 derived from infiltrating macrophages cooperates with GDF15 to establish an immune suppressive microenvironment in gallbladder cancer[J]. Cancer Lett, 2023, 563: 216184. doi: 10.1016/j.canlet.2023.216184.
- [7] Liu L, Liu Y, Zhu Y, et al. Exosomal leptin accelerates gallbladder carcinoma by promoting M2-subtype macrophage polarization [J]. Minerva Med, 2024, 115(2): 253–4. doi: 10.23736/S0026-4806.23.08612-3.
- [8] Kerneur C, Cano C E, Olive D. Major pathways involved in macrophage polarization in cancer[J]. Front Immunol, 2022, 13: 1026954. doi: 10.3389/fimmu.2022.1026954.
- [9] Gehren A S, De Souza W F, Sousa-Squiavinato A C M, et al. Parthenolide inhibits proliferation and invasion, promotes apoptosis, and reverts the cell-cell adhesion loss through downregulation of NF- κ B pathway TNF- α -activated in colorectal cancer cells[J]. Cell Biol Int, 2023, 47(9): 1638–49. doi: 10.1002/cbin.12060.
- [10] Han D, Zhu W, Chen Y, et al. Parthenolide induces ROS-dependent cell death in human gastric cancer cell[J]. Adv Clin Exp Med, 2024, 33(11): 1237–45. doi: 10.17219/acem/175152.
- [11] Sufian H B, Santos J M, Khan Z S, et al. Parthenolide reverses the epithelial to mesenchymal transition process in breast cancer by targeting TGF β 1: *in vitro* and *in silico* studies[J]. Life Sci, 2022, 301: 120610. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120610.
- [12] Cui M, Wang Z, Huang L T, et al. Parthenolide leads to proteomic differences in thyroid cancer cells and promotes apoptosis [J]. BMC Complement Med Ther, 2022, 22(1): 99. doi: 10.1186/s12906-022-03579-0.
- [13] Obulkasim H, Aji G, Abudoula A, et al. Parthenolide induces gallbladder cancer cell apoptosis *via* MAPK signalling[J]. Ann Med Surg (Lond), 2024, 86(4): 1956–66. doi: 10.1097/MS9.0000000000001828.
- [14] 樊湘力, 陈永顺. 肿瘤微环境调控癌细胞可塑性的研究进展 [J]. 武汉大学学报(医学版), 2024, 45(11): 1336–42. doi: 10.14188/j.1671-8852.2023.0625.
- [14] Fan X L, Chen Y S. Research progress on the regulation of cancer cell plasticity by tumor microenvironment [J]. Med J Wuhan Univ, 2024, 45(11): 1336–42. doi: 10.14188/j.1671-8852.2023.0625.
- [15] Zhang Q, Sioud M. Tumor-associated macrophage subsets: shaping polarization and targeting[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(8): 7493. doi: 10.3390/ijms24087493.
- [16] Chen P, Wang Y, Li J, et al. Diversity and intratumoral heterogeneity in human gallbladder cancer progression revealed by single-cell RNA sequencing[J]. Clin Transl Med, 2021, 11(6): e462. doi: 10.1002/ctm2.462.
- [17] Chen W, Chen M, Hong L, et al. M2-like tumor-associated macrophage-secreted CCL2 facilitates gallbladder cancer stemness and metastasis[J]. Exp Hematol Oncol, 2024, 13(1): 83. doi: 10.1186/s40164-024-00550-2.
- [18] Zhang Z, Qiao Y, Sun Q, et al. A novel SLC25A1 inhibitor, parthenolide, suppresses the growth and stemness of liver cancer stem cells with metabolic vulnerability[J]. Cell Death Discov, 2023, 9(1): 350. doi: 10.1038/s41420-023-01640-6.
- [19] Huang L, Liu F, Liu X, et al. Parthenolide inhibits the proliferation and migration of cervical cancer cells *via* FAK/GSK3 β pathway[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2024, 93(3): 203–13. doi: 10.1007/s00280-023-04621-9.
- [20] Tao G, Qian D, Li L, et al. Parthenolide promotes the repair of spinal cord injury by modulating M1/M2 polarization *via* the NF- κ B and STAT 1/3 signaling pathway [J]. Cell Death Discov, 2020, 6(1): 97. doi: 10.1038/s41420-020-00333-8.
- [21] Shi S, Tian X, Gong Y, et al. Pivotal role of JNK protein in the therapeutic efficacy of parthenolide against breast cancer: novel and comprehensive evidences from network pharmacology, single-cell RNA sequencing and metabolomics[J]. Int J Biol Macromol, 2024, 279(Pt 3): 135209. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.135209.
- [22] Zhang J, Zhou X, Hao H. Macrophage phenotype-switching in cancer[J]. Eur J Pharmacol, 2022, 931: 175229. doi: 10.1016/j.ejphar.2022.175229.
- [23] Pozzi S, Satchi-Fainaro R. The role of CCL2/CCR2 axis in cancer and inflammation; the next frontier in nanomedicine [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2024, 209: 115318. doi: 10.1016/j.addr.2024.115318.
- [24] Qin R, Ren W, Ya G, et al. Role of chemokines in the crosstalk between tumor and tumor-associated macrophages [J]. Clin Exp Med, 2023, 23(5): 1359–73. doi: 10.1007/s10238-022-00888-z.
- [25] Wang X, Wang J, Zhao J, et al. HMGA2 facilitates colorectal cancer progression *via* STAT3-mediated tumor-associated macrophage recruitment [J]. Theranostics, 2022, 12(2): 963–75. doi: 10.7150/thno.65411.
- [26] Zhou C, Weng J, Liu C, et al. Disruption of SLFN11 deficiency-induced CCL2 signaling and macrophage M2 polarization potentiates anti-PD-1 therapy efficacy in hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2023, 164(7): 1261–78. doi: 10.1053/j.gastro.2023.02.005.

Parthenolide inhibits the malignant progression of gallbladder cancer cells by regulating CCL2-mediated phenotypic polarization of tumor-associated macrophages

Li Hongchen, Halimulati Wubulikasimu, Chen Jun

(Dept of General Surgery, Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000)

Abstract Objective To explore the role and molecular mechanism of parthenolide (PTL) in regulating tumor-associated macrophage (TAM) polarization to inhibit the malignant progression of gallbladder cancer cells. **Methods**

M0 macrophages were co-cultured with human gallbladder cancer cell line GBC-SD and treated with PTL, and the cells were divided into control group, TAM group, TAM + PTL group. Flow cytometry was used to determine the levels of CD86 and CD206 in macrophages. RT-qPCR and Western blot were used to determine the expressions of CD163, interleukin-10 (IL-10) and arginase-1 (Arg-1). ELISA and Western blot were used to determine the secretion of CC chemokine ligand 2 (CCL2) in the supernatant of GBC-SD cells and the expression of CCL2 in the cells. GBC-SD cells were transfected with a CCL2 overexpression vector and divided into TAM, TAM + PTL, TAM + PTL + OE-NC, TAM + PTL + OE-CCL2 groups. Flow cytometry was used to assess CD86 and CD206 levels in macrophages, RT-qPCR and Western blot were used to assess CD163, IL-10 and Arg-1 expression. CCK-8 assay, plate-based colony formation assay and Transwell chamber assay were used to assess GBC-SD cell proliferation, migration and invasion, respectively. **Results** Compared with the TAM group, the TAM + PTL group showed increased CD86 expression and decreased CD206 expression in macrophages, the mRNA and protein expressions of CD163, IL-10 and Arg-1 were downregulated, the CCL2 content and protein expression in GBC-SD cells decreased, cell proliferation activity, colony formation, migration and invasion were all reduced ($P < 0.05$). Compared with the TAM + PTL group, the TAM + PTL + OE-CCL2 group showed decreased CD86 expression and increased CD206 expression in macrophages, the mRNA and protein expressions of CD163, IL-10 and Arg-1 were upregulated. Cell proliferation activity was enhanced, and colony formation, migration, and invasion all increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Parthenolide inhibits the polarization of macrophages in TAM to M2 type by downregulating CCL2 expression in gallbladder cancer cells, thereby preventing the proliferation, migration and invasion of gallbladder cancer cells.

Key words gallbladder cancer; parthenolide; tumor-associated macrophage; CC chemokine ligand 2; proliferation; migration; invasion

Fund program Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (No. 2021D01C240)

Corresponding author Chen Jun, E-mail: chenjun1974@126.com