DOI:10.16016/j.2097-0927.202401021

PTPRZ1 高表达胶质瘤干细胞诱导 TAM 向 M2 免疫抑制表型极化的机制研究

安乐乐[1],杨 莹[1],刘 庆[1],窦飞越[2],王路静[1],程 玥[1],王 超[1],阮潜瑛[3],周 磊[1],郭海涛[1],孔维凯[1],李学刚[4],兰 川[4],李 飞[4],时 雨[1,2] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院:病理科[1],输血科[3],神经外科[4];400039 重庆,金凤实验室,渝粤病理科学研究中心[2]

[摘要] **目的** 探究蛋白酪氨酸磷酸酶受体 Z1 型(protein tyrosine phosphatase receptor-type Z1,PTPRZ1)高表达胶质瘤干细胞(glioma stem cells,GSCs)对肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage,TAM)表型极化和吞噬能力的影响及其调控机制。**方法** 利用流式细胞术分选人胶质母细胞瘤(glioblastoma,GBM)样本中 GSCs 和非干性肿瘤细胞(non-stem tumor cells,NSTCs),并检测 PTPRZ1 表达。用胶质瘤细胞条件培养基或趋化因子配体 20(chemokine C-C motif ligand 20,CCL20)诱导外周单核细胞(peripheral blood mononuclear cells,PBMC)来源的 CD14 阳性单核细胞向 TAM 极化。通过 CRISPR/Cas9 技术构建 PTPRZ1 稳定敲除的 GSCs 细胞株(PTPRZ1-KO GSCs)。利用流式细胞术检测 TAM 吞噬 GSCs、NSTCs、PTPRZ1-Control GSCs(PTPRZ1-Ctrl GSCs)和 PTPRZ1-KO GSCs 的能力和 TAM 免疫抑制(M2)表型极化标记物 CD163 的表达。于基因表达综合数据库(gene expression omnibus,GEO)中配对 GSCs 和 NSTCs 转录组测序数据(GSE54791)中获得差异表达基因;于癌症和肿瘤基因图谱(the cancer genome atlas,TCGA)数据库 GBM 队列中鉴定预后不良基因集。上述基因集与编码人膜蛋白基因集取交集获得 PTRRZ1,利用基因集富集分析(gene set enrichment Analysis,GSEA)比较 TCGA 数据库中高表达和低表达 PTPRZ1 的 GBM 样本的差异通路。利用转录组测序鉴定 PTPRZ1-Ctrl GSCs 和 PTPRZ1-KO GSCs 组中差异表达基因并通过 RT-qPCR 和 Western blot 验证。**结果** 与 NSTCs 比较,GSCs 抵抗 TAM 吞噬的能力较强($P<0.05$)且特异性高表达 PTPRZ1。PTPRZ1-KO GSCs 抵抗 TAM 吞噬的能力显著下降($P<0.01$)。高表达 PTPRZ1 的 GBM 样本中吞噬相关通路活化显著受抑($P<0.05$)。PTPRZ1-KO GSCs 显著下调 M2 型 TAM 极化相关趋化因子 CCL20 的表达($P<0.05$)。CCL20 重组蛋白诱导 M2 型 TAM 标记物 CD163 表达升高。**结论** PTPRZ1 高表达 GSCs 介导 TAM 向 M2 型极化并抑制其吞噬能力,机制可能与 PTPRZ1 高表达 GSCs 上调 CCL20 表达有关。

[关键词] 胶质瘤干细胞;肿瘤相关巨噬细胞;细胞吞噬;PTPRZ1
[中图法分类号] R394.3;R730.23;R730.264 [文献标志码] A

Mechanism of glioma stem cells with high expression of PTPRZ1 inducing TAMs polarization to M2 immunosuppressive phenotype

AN Lele[1], YANG Ying[1], LIU Qing[1], DOU Feiyue[2], WANG Lujing[1], CHENG Yue[1], WANG Chao[1], RUAN Qianying[3], ZHOU Lei[1], GUO Haitao[1], KONG Weikai[1], LI Xuegang[4], LAN Chuan[4], LI Fei[4], SHI Yu[1,2] [1]Department of Pathology, [3]Department of Blood Transfusion, [4]Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [2]Yu-Yue Pathology Scientific Research Center, Jinfeng Laboratory, Chongqing, 400039, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect of glioma stem cells with high expression of protein tyrosin phosphatase receptor type Z1 (PTPRZ1) on the phenotypic polarization and phagocytosis of tumor-

[基金项目] 国家重点研发计划干细胞专项青年科学家项目(2021YFA1103000);国家自然科学基金面上项目(82373191);国家自然科学基金青年基金项目(82102889);重庆市自然科学基金博士后科学基金项目(cstc2021jcyj-bshX0063)

[通信作者] 时 雨,E-mail:shiyu@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

associated macrophages and its regulatory mechanism. **Methods** GSCs and non-stem tumor cells (NSTCs) were screened out from human glioblastoma (GBM) specimens using flow cytometry, and the PTPRZ1 expression in paired GSCs and NSTCs were detected. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC)-derived $CD14^+$ monocytes were exposed to the conditioned medium from glioma cells or recombinant chemokine C-C motif ligand 20 (CCL20) for TAM polarization. Stable PTPRZ1 knockout GSCs (PTPRZ1-KO GSCs) were constructed using CRISPR/Cas9. TAM phagocytosis to GSCs, NSTCs, PTPRZ1-Control GSCs (PTPRZ1-Ctrl GSCs) and PTPRZ1-KO GSCs and the expression of immunosuppressive phenotype (M2) polarization marker CD163 were examined using flow cytometry. Differentially expressed genes (DEGs) between paired GSCs and NSTCs were determined using a bulk RNA-sequencing dataset (GSE54791) from Gene Expression Omnibus (GEO). A gene set informing worse outcome of patients with GBM was generated using The Cancer Genome Atlas (TCGA)-GBM cohort. By intersecting the aforementioned gene set with the gene set that encodes for human membrance proteins, the PTPRZ1 gene is obtained. Gene set enrichment analysis (GSEA) was used for pathway enrichment analysis to compare the differentially regulated pathways between GBMs with high or low PTPRZ1 expression. Bulk RNA sequencing, qRT-PCR and Western blotting were used to identify the DEGs between PTPRZ1-KO GSCs and PTPRZ1-Ctrl GSCs. **Results** GSCs were more capable of escaping from TAM phagocytosis than NSTCs ($P<0.05$) and had specifically up-regulated PTPRZ1 expression. PTPRZ1-KO significantly suppressed GSCs escaping from TAM phagocytosis ($P<0.01$). GBMs with high PTPRZ1 expression showed significant inhibition of pathways mediating phagocytosis ($P<0.05$). The expression of CCL20 as a M2 TAM polarization chemokine was significantly down-regulated in PTPRZ1-KO GSCs ($P<0.05$). Treatment with recombinant CCL20 up-regulated the expression of CD163 as a M2 TAM marker in TAM. **Conclusion** $PTPRZ1^+$ GSCs mediate M2 TAM polarization and inhibit TAM phagocytosis, which may be related to the up-regulation of CCL20 in $PTPRZ1^+$ GSCs.

[**Key words**] glioma stem cells; tumor-associated macrophages; cell phagocytosis; PTPRZ1

Supported by the National Key Research and Development Program for Young Scientists in Stem Cells of China (2021YFA1103000), the General Program of National Natureal Science Foundation of China (82373191), the National Nature Science Foundation for Young Scholars of China (82102889) and the Postdoctoral Science Foundation of Chongqing Natural Science Foundation (cstc2021jcyj-bshX0063). Corresponding author: SHI Yu, E-mail: shiyu@tmmu.edu.cn

胶质母细胞瘤(glioblastoma,GBM)是常见的成人中枢神经系统原发恶性肿瘤,起病隐匿,进展快,易复发,患者中位生存期仅为14~16个月[1-2]。胶质瘤干细胞(glioma stem cells,GSCs)是促进胶质瘤发生和演进并导致肿瘤耐药及复发的关键因素[3-4]。业已证实,与非干性肿瘤细胞(non-stem tumor cells,NSTCs)相比,GSCs高表达CD133和CD15等干性标志物并具有自我更新能力和多向分化潜能[5]。GBM瘤内浸润的肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages,TAM)多由外周血单核细胞向瘤内募集而产生,其占比为GBM内全部免疫细胞的10%~50%[6]。外周单核细胞募集进入肿瘤后,会被肿瘤微环境中的各类因子诱导发生表型极化,呈现促炎活化(M1)表型或免疫抑制(M2)表型。业已证明,GBM内GSCs与TAM空间分布存在毗邻关系,提示GSCs与TAM可能密切相互作用。本课题组前期研究发现,阻断蛋白酪氨酸磷酸酶受体Z1型(protein tyrosine phosphatase receptor-type Z1,PTPRZ1)通路可显著抑制GSCs干性表型和肿瘤生长,提示PTPRZ1是介导GSCs恶性生物学表型的重要分子[5,7]。

新近研究发现,GSCs主动塑造GBM免疫抑制性微环境,抑制瘤内浸润免疫细胞的抗肿瘤活性[7]。GBM中大量浸润的TAM多呈现M2表型,而M1表型受抑。M2表型TAM吞噬能力下降,抗原呈递功能减弱,抑制T细胞活化并诱导细胞毒性T细胞耗竭,促进GBM进展。但高表达PTPRZ1的GSCs如何调控TAM向M1或M2型极化及其对TAM吞噬能力的影响和具体机制仍不清楚。鉴于此,本研究拟通过生物信息学分析和细胞功能实验,阐明GSCs对诱导M2型TAM极化和TAM吞噬的影响和调控机制。

1 材料与方法

1.1 细胞、质粒、菌株和GBM组织样本

人GBM组织样本来自陆军军医大学第一附属医

院生物样本库。所有样本的使用通过患者和监护人知情同意并经过伦理审查委员会批准(KY2022138)。新鲜获得的GBM样本解离后用流式细胞术分选富集获取GSCs($CD15^+/CD133^+$)和NSTCs($CD15^-/CD133^-$)。人新鲜外周血白膜层来源于陆军军医大学第一附属医院血库并经伦理审查委员会批准(KY2022138)。小向导RNA(small guide RNA,sgRNA)原始质粒购自北京全式金公司。

1.2 主要试剂和耗材

Ficoll-Paque™ PLUS淋巴细胞分离液购自英国GE Healthcare公司;人CD14微珠(CD14 MicroBeads)购自德国Miltenyi公司;洛斯维·帕克纪念研究所(Roswell Park Memorial Institute,RPMI)1640培养基、胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)、Neurobasal培养基和B27补充剂购自美国Gibco公司;表皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子购自美国PeproTech公司;木瓜蛋白酶解离试剂盒购自美国Worthington公司;异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC)缀合的抗人CD15流式抗体购自美国BD Biosciences公司;藻红蛋白(phycoerythrin,PE)缀合的抗人CD133流式抗体购自德国Miltenyi公司;Horizon Brilliant Violet 421™缀合的抗人CD11b流式抗体、Horizon Brilliant Violet 510™缀合的抗人CD163流式抗体和Fixable Viability Dye eFluor 780流式抗体购自美国BioLegend公司;抗人CCL20抗体购自英国Abcam公司;抗人趋化因子配体2(C-X-C motif chemokine ligand 2,CXCL2)抗体购自美国Thermo Fisher Scientific公司;抗人β肌动蛋白(β-actin)抗体购自德国Cell Signaling Technology公司;细胞膜红色荧光染色试剂盒(DiL kit)购自上海碧云天公司;Costar超低黏附6孔板和96孔板购自美国Coring公司;FlyCut Not Ⅰ、FlyCut Xba Ⅰ seamless cloning试剂盒、TransScript® Ⅳ One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix和TransScript® Ⅱ Green One-step RT-qPCR SuperMix购自北京全式金生物公司;PCR引物序列设计来源于美国国家生物技术信息中心(national center for biotechnology information,NCBI)网站;引物由北京擎科生物公司合成;人CXCL2重组蛋白和CCL20重组蛋白购自美国MedChemExpress公司。

1.3 方法

1.3.1 TAM诱导分化 将新鲜获得人外周血白膜层用蔗糖密度梯度离心,获得外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)。用人CD14微珠富集CD14阳性单核细胞,计数后以3×10^6/孔均匀铺于超低黏附6孔板中,使用含1%双抗、10% FBS的RPMI 1640为基础培养基并加入巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor,M-CSF)(20 ng/mL)诱导分化。分化至第4天换液,将培养基换为胶质瘤细胞培养上清与巨噬细胞培养基按照体积比1∶1混合的条件培养基,48 h后收集TAM,用RT-qPCR和流式细胞术检测M2表型TAM相关标记物CD163的表达。经上述方法培养分化的TAM用于后续实验。

1.3.2 GSCs分离和培养 用木瓜蛋白酶系统将新鲜人GBM组织标本解离为单个细胞,置于神经干细胞培养基[Neurobasal培养基中加入B27补充剂、表皮生长因子(10 ng/mL)和碱性成纤维细胞生长因子(10 ng/mL)]中,使用FITC-CD15流式抗体和PE-CD133流式抗体在4 ℃孵育细胞40 min,经BD FACSAria Ⅱ流式细胞仪分离富集获得GSCs($CD15^+/CD133^+$)和NSTCs($CD15^-/CD133^-$),在37 ℃和5% CO_2的培养箱里培养并鉴定GSCs干性特征[5]。

1.3.3 稳定敲除PTPRZ1(PTPRZ1-KO)的GSCs细胞株构建 利用NCBI数据库中查找人PTPRZ1基因组序列并利用zlab网站(https://www.zlab.bio/guide-design-resources)设计打靶序列(ACTAATGACTACCG-TGTCAG),选择综合评分较高者作为后续合成验证序列。通过酶切连接构建CRISPR/Cas9-PTPRZ1慢病毒载体,并包装为慢病毒。GSCs加入PTPRZ1-sgRNA慢病毒感染细胞48 h,通过流式细胞仪分选PTPRZ1-KO GSCs并检测基因敲除效率。未转染慢病毒的GSCs作为PTPRZ1-Control(PTPRZ1-Ctrl GSCs)。

1.3.4 转录组测序 收集PTPRZ1-Ctrl GSCs组和PTPRZ1-KO GSCs组细胞沉淀,使用RNA提取试剂盒提取RNA。使用多聚胸腺嘧啶、T重复寡核苷酸[oligo(dT)]微珠纯化信使RNA(messenger RNA,mRNA),利用离子化方式打断为300 bp左右的片段,反转录合成双链互补DNA(complementary DNA,cDNA),双链末端修复及3′末端加poly(A)尾。使用特定测序接头连接DNA片段两端,高保真聚合酶扩增构建测序文库。基于Illumina测序平台测序,得到fastq数据。

1.3.5 吞噬实验 TAM诱导分化至第6天,消化细胞以1×10^5/孔铺于超低黏附96孔板中培养16 h,将GSCs、NSTCs、PTPRZ1-Ctrl GSCs和PTPRZ1-KO GSCs用DiL kit染色5 min。按照TAM与肿瘤细胞比例为1∶1共培养4 h,使用BV421-CD11b流式抗体4 ℃染色30 min,使用BD LSRFortessa™流式细胞仪检测TAM吞噬比例。

1.3.6 Western blot实验 收集PTPRZ1-Ctrl GSCs组与PTPRZ1-KO GSCs组细胞沉淀并提取总蛋白。用

BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定各组蛋白浓度,将浓度调平后加入等量体积样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE),后转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上。5%脱脂奶粉封闭膜 1 h,加入抗体稀释液配制好的抗人 CCL20 抗体、CXCL2 抗体和 β-actin 抗体,4 ℃孵育 16 h。次日加入辣根过氧化物酶标记二抗,37 ℃孵育 1 h 后,使用 SuperSignal™ West Pico PLUS 化学发光底物在 ChemiDocTM MP 成像系统(美国 Bio-Rad 公司)显影观察。利用 Image J 软件定量灰度值,根据内参蛋白 β-actin 计算 CCL20 和 CXCL2 蛋白的相对表达量。

1.3.7 RT-qPCR 收集细胞沉淀使用 RNA 提取试剂盒按步骤提取后测浓度,使用反转录试剂盒按照说明书反转录获得 cDNA。按照 TransScript Ⅱ Green One-Step qRT-PCR SuperMix 配置反应体系 20 μL,每组设置 4 个复孔,采用 Veriti™ 96 孔快速热循环仪(美国 Applied Biosystems 公司)完成反应,测定基因 mRNA 的表达水平。以 β-actin 为内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因的相对表达量。

表 1 基因引物序列

基因	引物序列(5′-3′)
CXCL2	正向:GGCAGAAAGCTTGTCTCAACCC
	反向:CTCCTTCAGGAACAGCCACCAA
CCL20	正向:TGCTGTACCAAGAGTTTGCTC
	反向:CGCACACAGACAACTTTTTCTTT
ACTB	正向:CTCCTCCGAGTCAACAGATTCA
	反向:CAACAGCTTCTGAGGTAGGGA

1.3.8 流式细胞术检测 TAM 中 CD163 表达情况 将诱导分化至第 4 天的 TAM 加入人 CXCL2 重组蛋白(10 ng/mL)、CCL20 重组蛋白(10 ng/mL)或相同体积含 5%海藻糖的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)培养 72 h。加入 BV510-CD163 抗体孵育 30 min 后,利用 BD LSRFortessa™ 流式细胞仪检测 CD163 表达水平。

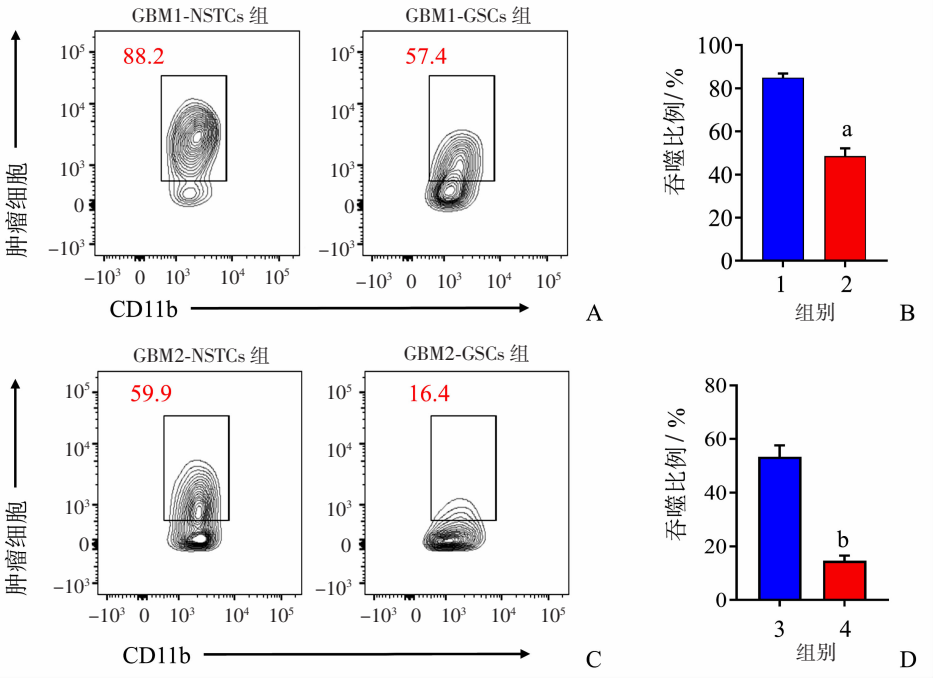
1.3.9 生物信息学分析 使用 R 4.3.2 软件中的 limma 包对基因表达综合数据库(gene expression omnibus, GEO)数据库中 GSE54791 数据集分析差异表达基因,筛选阈值参数设置为:$P<0.05$ 且 $|\log_2 FC|>2$。癌症和肿瘤基因图谱(the cancer genome atlas, TCGA)-GBM 数据来自在线数据库(https://portal.gdc.cancer.gov),利用 R 软件 sur.cut 函数获得最佳 cut-off 值后,将 GBM 样本分为靶基因高表达和低表达 2 组,利用 tinyarray 和 patchwork 包批量分析生存时间,筛选获得与 GBM 患者不良预后相关基因集。利用 clusterProfiler 包对 TCGA 数据库中 PTPRZ1 高表达组和低表达组的差异基因进行 GSEA 富集分析,筛选阈值参数设置为:$P<0.05$,获得吞噬功能相关信号通路的差异,利用 GseaVis 包对基因集富集分析(gene set enrichment Analysis,GSEA)富集结果进行可视化展示。人膜蛋白编码基因集来自在线数据库(https://www.proteinatlas.org)。使用 Venn 包将三者取交集。

1.4 统计学分析 使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据统计。使用 $\bar{x}\pm s$ 表示计量资料,使用两独立样本 t 检验进行两样本间统计学差异分析。若 $P<0.05$ 则认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 GSCs 抵抗 TAM 吞噬的能力强 为比较 GSCs 和 NSTCs 抵抗 TAM 吞噬的差异,分别从 2 例人 GBM 样本中分选富集得到 GSCs 和 NSTCs,并检测 GSCs 和 NSTCs 抵抗人 PBMC 来源 TAM 吞噬的能力。流式细胞术检测结果表明,GBM1 和 GBM2 这 2 例原代 GBM 样本中 GSCs 抵抗 TAM 吞噬能力显著高于 NSTCs 组(GBM1:$P<0.05$,图 1A、B;GBM2:$P<0.01$,图 1C、D)。以上结果提示,GSCs 抵抗 TAM 吞噬能力显著高于 NSTCs。

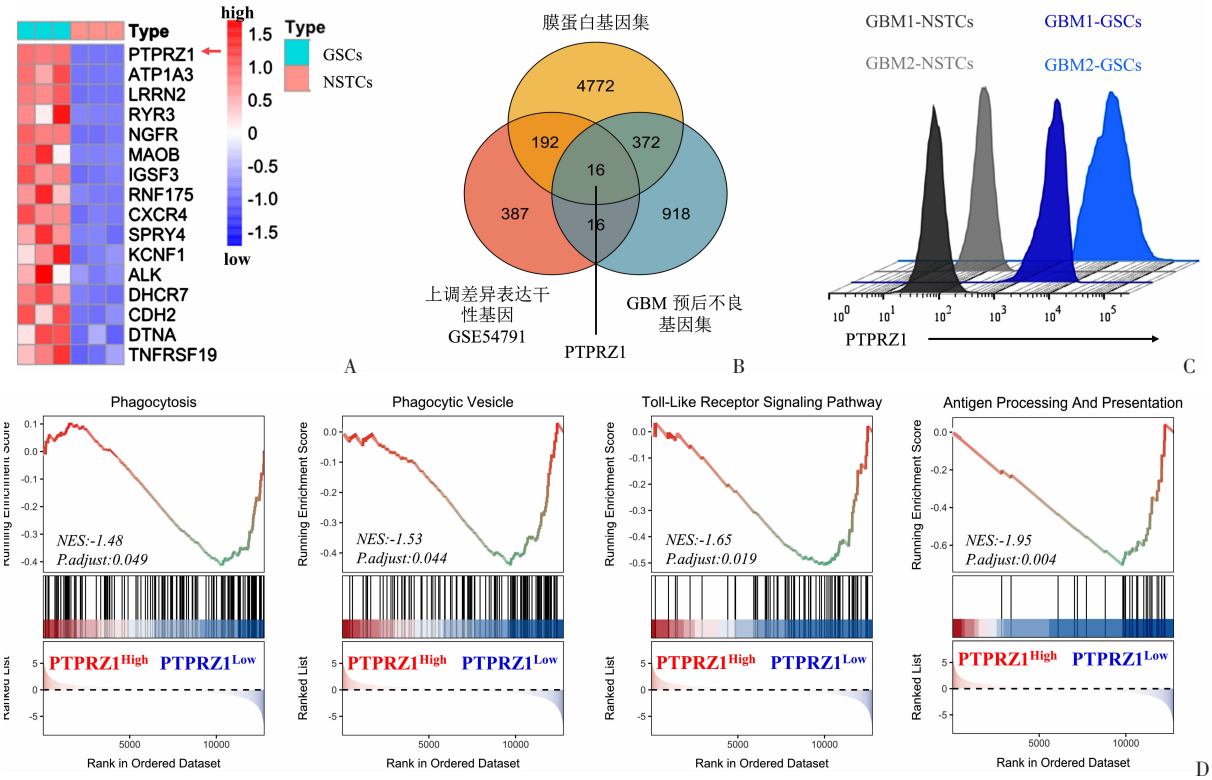
2.2 GSCs 特异性高表达 PTPRZ1 且抑制吞噬通路 为进一步探究 GSCs 抵抗 TAM 吞噬的机制,本研究分析了 GSCs 与 NSTCs 的差异表达基因。GSE54791 数据集分析结果显示,与 NSTCs 比较,GSCs 高表达 611 个基因;其中 PTPRZ1 在 GSCs 中上调表达最明显(图 2A)。鉴于肿瘤细胞抵抗 TAM 吞噬提示肿瘤患者预后差且上述行为多与肿瘤细胞表达的膜蛋白有关,本研究将 GSCs 上调表达基因与 TCGA-GBM 数据库中预后不良基因集和编码人膜蛋白的基因数据集(https://www.proteinatlas.org/humanproteome/tissue/secretome)取交集,证实膜蛋白 PTPRZ1 在 GSCs 高表达提示 GBM 患者预后不良(图 2B)。流式细胞术检测结果也证实,与 NSTCs 相比,2 例原代 GSCs 特异性高表达 PTPRZ1(图 2C)。GSEA 通路富集分析 TCGA-GBM 数据库结果提示,与 PTPRZ1 低表达($PTPRZ1^{Low}$)的 GBM 样本比较,PTPRZ1 高表达($PTPRZ1^{High}$)的 GBM 样本中与 TAM 吞噬功能相关的通路(细胞吞噬、吞噬小泡形成、Toll 样受体信号、抗原加工呈递)显著抑制($P<0.05$,图 2D)。以上结果提示,PTPRZ1 高表达于 GSCs 且 PTPRZ1 高表达的 GBM 样本中吞噬功能相关通路受抑。



1:GBM1-NSTCs 组;2:GBM1-GSCs 组;3:GBM2-NSTCs 组;4:GBM2-GSCs 组

A、B:流式细胞术检测 TAM 吞噬 GBM1-GSCs 与 GBM1-NSTCs 的能力与比例统计 a:$P<0.05$,与 GBM1-NSTCs 组比较;C、D:流式细胞术检测 TAM 吞噬 GBM2-GSCs 与 GBM2-NSTCs 的能力与比例统计 b:$P<0.01$,与 GBM2-NSTCs 组比较

图 1 TAM 吞噬 GSCs 与 NSTCs 能力检测 ($n=3,\bar{x}\pm s$)



A:胶质瘤干细胞与非干性肿瘤细胞差异基因热图;B:胶质瘤干细胞高表达基因集、GBM 预后不良基因集与人膜蛋白基因集交集韦恩图;C:流式细胞术检测 GBM1-GSCs 与 GBM1-NSTCs 和 GBM2-GSCs 与 GBM2-NSTCs 细胞 PTPRZ1 表达;D:PTPRZ1 高表达与 PTPRZ1 低表达 GBM 样本 GSEA 通路富集分析

图 2 GSCs 和 NSTCs 中 PTPRZ1 表达检测及 TCGA-GBM 样本吞噬功能相关通路分析

2.3　敲除 PTPRZ1 后 GSCs 抵抗 TAM 吞噬能力下降

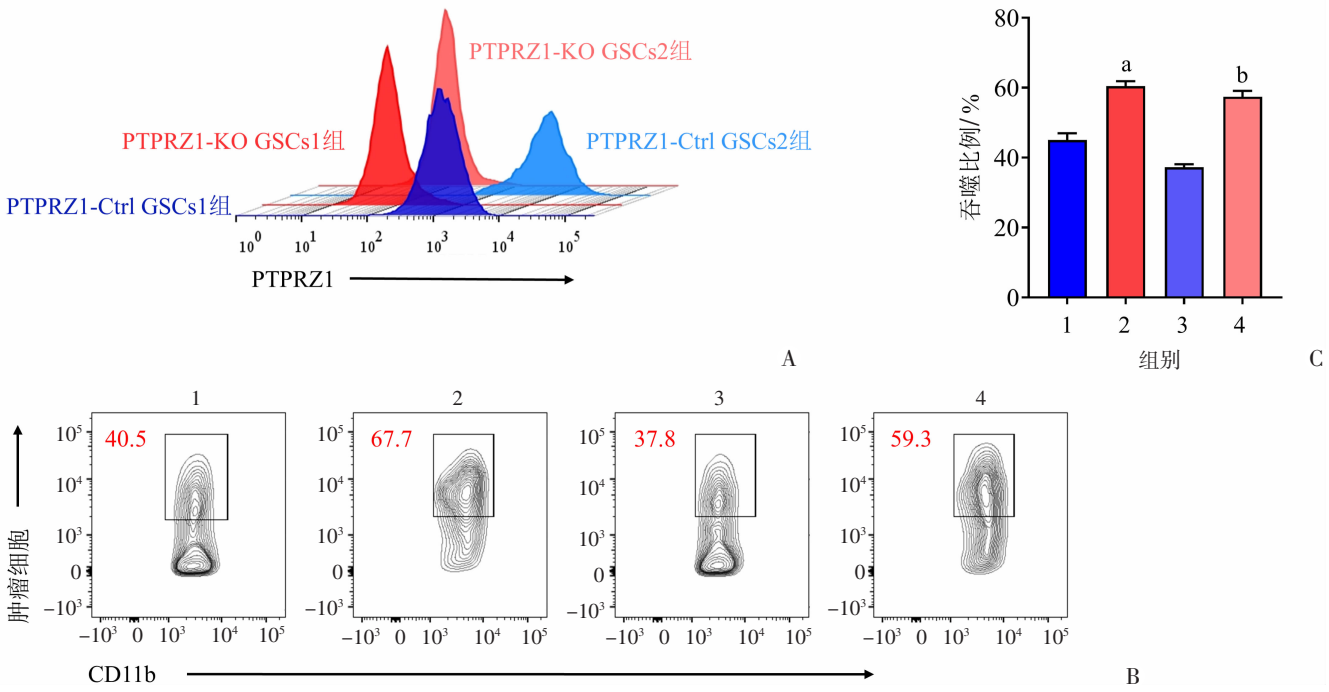
为进一步探究 PTPRZ1 是否为 GSCs 抵抗 TAM 吞噬能力中的关键分子,本研究成功构建了 PTPRZ1-KO 的 GSCs 并验证其抵抗 TAM 吞噬的能力。流式细胞术证实 2 株原代 GSCs 中 PTPRZ1 敲除效果(图 3A)。流式细胞术检测结果显示,与 PTPRZ1-Ctrl GSCs1 和 GSCs2 比较,对应 PTPRZ1-KO GSCs1 和 GSCs2 组抵抗 TAM 吞噬能力显著下降($P<0.01$,图 3B、C)。以上结果提示,PTPRZ1 高表达促进 GSCs 抵抗 TAM 吞噬。

2.4　PTPRZ1 介导 TAM 向 M2 型极化,维持 GSCs 抗吞噬能力

为进一步探索 PTPRZ1 维持 GSCs 抵抗 TAM 吞噬能力的机制,将 PTPRZ1-KO GSCs 与 PTPRZ1-Ctrl GSCs 进行转录组测序。数据分析显示:与 PTPRZ1-Ctrl GSCs 比较,PTPRZ1-KO GSCs 下调表达 252 个基因,依据统计学差异显著性排序展示前 17 位差异表达基因(图 4A)。为了进一步验证上述结果,选取与 M2 型 TAM 表型极化相关的趋化因子 CXCL2 和 CCL20 作为候选验证分子进行验证。RT-qPCR 结果提示,与 PTPRZ1-Ctrl GSCs 比较,PTPRZ1-KO GSCs 的 CXCL2 和 CCL20 的转录水平显著下降($P<0.05$,图 4B)。Western blot 结果提示:与 PTPRZ1-Ctrl GSCs 比较,PTPRZ1-KO GSCs 中 CXCL2 和 CCL20 蛋白表达水平明显下降($P<0.05$,图 4C、D)。流式细胞检测结果显示:与对照组比较,CCL20 重组蛋白处理 TAM,可促进 M2 型标记物 CD163 表达水平升高,提示 CCL20 可促进 TAM 向 M2 型极化。然而,CXCL2 重组蛋白处理并未观察到 CD163 表达升高(图 4E)。以上结果提示 PTPRZ1 高表达 GSCs 可能通过分泌 CCL20 诱导 TAM 向 M2 型极化,进而抑制 TAM 吞噬能力。

3　讨论

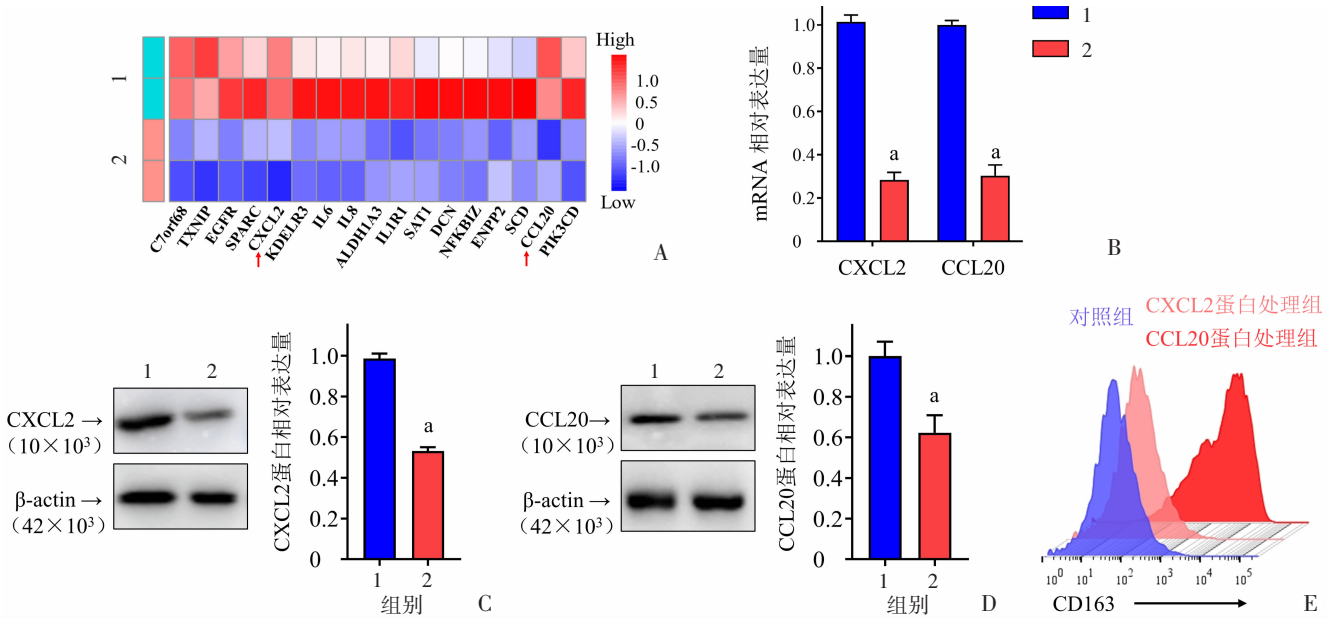
TAM 是 GBM 微环境中浸润数量最多的免疫细胞[9-10]。既往研究提示,GSCs 与 TAM 存在密切相互作用并促进肿瘤发生发展。GSCs 及其微环境产生多种细胞因子和趋化因子促进骨髓来源单核细胞向 GBM 募集,并进一步将单核细胞诱导为 M2 型 TAM。例如,GSCs 旁分泌的骨膜素(periostin,POSTN)、Wnt 诱导信号蛋白 1(Wnt1-inducible signaling pathway protein 1,WISP1)与 TAM 表面对应的整合素受体结合,募集 TAM 并诱导其向 M2 型极化,有效抑制其吞噬活性[11-12]。GSCs 还可通过膜蛋白直接与 TAM 相互作用,诱导 TAM 表型塑造。此外,GSCs 还可通过产生乳酸等代谢产物或释放外泌体,诱导 TAM 极化为 M2 型。本研究发现,PTPRZ1 高表达 GSCs 诱导 TAM 向 M2 型极化的机制可能与其高表达趋化因子 CCL20 有关。



1:PTPRZ1-Ctrl GSCs1 组;2:PTPRZ1-KO GSCs1 组;3:PTPRZ1-Ctrl GSCs2 组;4:PTPRZ1-KO GSCs2 组

A:流式细胞术检测 PTPRZ1 表达;B、C:流式细胞术检测 2 株 PTPRZ1-Ctrl GSCs 组与对应 2 株 PTPRZ1-KO GSCs 组细胞抵抗 TAM 吞噬的能力与比例统计　a:$P<0.01$,与 PTPRZ1-Ctrl GSCs1 组比较;b:$P<0.01$,与 PTPRZ1-Ctrl GSCs2 组比较

图 3　敲除 PTPRZ1 的 GSCs 抵抗 TAM 吞噬能力的检测　($n=3$,$\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.05$,与 PTPRZ1-Ctrl GSCs 组比较;1:PTPRZ1-Ctrl GSCs 组;2:PTPRZ1-KO GSCs 组

A:2 组差异基因热图 ↑:示候选分子;B:PCR 检测 CXCL2 和 CCL20 mRNA 表达;C:Western blot 检测 CXCL2 蛋白表达并定量分析;D:Western blot 检测 CCL20 蛋白表达并定量分析;E:流式细胞术检测 CXCL2 和 CCL20 重组蛋白处理 TAM 后 CD163 表达

图 4 CCL20 和 CXCL2 表达检测及其对 TAM 向 M2 型极化的影响 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

PTPRZ1-KO GSCs 中显著下调 CCL20,且经 CCL20 重组蛋白刺激后的 TAM 呈现 M2 型极化。已有研究证实,多种实体肿瘤中的肿瘤干细胞大量分泌 CCL20 促进肿瘤进展[13]。肿瘤源性 CCL20 与免疫细胞表面受体 C-C 基序趋化因子受体 6(C-C motif chemokine receptor 6,CCR6)结合促进肿瘤免疫抑制性微环境的形成[14-15]。此外,肿瘤细胞源性 CCL20 可诱导 TAM 向 M2 型极化,进而促进结直肠癌肺转移[16],与本研究发现一致。

鉴于 GSCs 和 M2 型 TAM 相互作用能促进肿瘤生长,阻断 GSCs 与 M2 型 TAM 的相互作用或可抑制肿瘤演进。既往研究发现,靶向阻断 C-C 基序趋化因子配体 2(C-C motif chemokine ligand 2,CCL2)通路能抑制 TAM 募集[17]。利用特异性靶向 CD206 表达的纳米脂质体载体可有效杀伤 M2 型 TAM[18]。靶向干预 IL-6 和 IL-10 等炎症因子可抑制 M2 型 TAM 极化,能抑制肿瘤生长并与化疗和放疗等常规治疗联合,提高抗肿瘤治疗效果。鉴于本研究发现 CCL20 能促进 TAM 向 M2 型极化且靶向 CCL20 的阻断抗体或抑制剂已被临床前研究证实可有效抑制结直肠癌内免疫抑制性细胞浸润[19],上述 CCL20 靶向药或可作为抑制胶质瘤内 TAM 向 M2 型极化的潜在免疫治疗药物。

GSCs 主动逃逸 TAM 杀伤是肿瘤细胞存活和肿瘤演进的重要机制。既往研究提示,GSCs 通过下调信号转导和转录激活因子 1(signal transducer and activator of transcription 1,STAT1)的表达,抵抗Ⅰ型干扰素诱导的肿瘤杀伤效应。此外,GSCs 高表达 CD47 等吞噬检查点抑制分子,其与 TAM 细胞上对应的受体信号调控蛋白 α(signal regulatory protein alpha,SIRPα)等结合能抑制 TAM 吞噬,进而促进肿瘤细胞逃避 TAM 吞噬杀伤。阻断 GSCs 与 TAM 上的吞噬检查点分子可增强 TAM 吞噬能力[20]。本研究发现高表达 PTPRZ1 的 GSCs 抵抗 TAM 吞噬能力显著高于 NSTCs,敲除 PTPRZ1 的 GSCs 抵抗 TAM 的吞噬能力显著下降,提示 PTPRZ1 或可作为吞噬免疫检查点分子。本课题组前期研发的 PTPRZ1 单克隆抗体能有效抑制 GSCs 自我更新和侵袭[6],但其能否用于靶向阻断 GSCs 抵抗 TAM 吞噬,效果和机制尚不明确。未来进一步研发靶向 PTPRZ1 的单克隆抗体或其他针对 PTPRZ1 的小分子抑制剂,或具有潜在的 GSCs 靶向免疫治疗价值。

参考文献:

[1] TAN A C, ASHLEY D M, LÓPEZ G Y, *et al*. Management of glioblastoma: state of the art and future directions[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(4): 299-312. DOI: 10.3322/caac.21613.

[2] 罗静远,杨静,李雪,等. 2-脱氧葡萄糖修饰共载 siPD-L1 及替莫唑胺脂质纳米粒的脑靶向性研究[J]. 空军军医大学学报,2024,45(1):73-79. DOI: 10.13276/j.issn.2097-1656.2024.01.015.
LUO J Y, YANG J, LI X, *et al*. Brain targeting of 2-

deoxyglucose modified lipid nanoparticles co-loaded with siPD-L1 and temozolomide[J]. J Air Force Med Univ,2024,45(1):73-79. DOI: 10.13276/j.issn.2097-1656.2024.01.015.

[3] GISINA A, KHOLODENKO I, KIM Y, *et al*. Glioma stem cells: novel data obtained by single-cell sequencing[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(22): 14224. DOI: 10.3390/ijms232214224.

[4] BOYD N H, TRAN A N, BERNSTOCK J D, *et al*. Glioma stem cells and their roles within the hypoxic tumor microenvironment[J]. Theranostics, 2021, 11(2): 665-683. DOI: 10.7150/thno.41692.

[5] SHI Y, PING Y F, ZHOU W C, *et al*. Tumour-associated macrophages secrete pleiotrophin to promote PTPRZ1 signalling in glioblastoma stem cells for tumour growth[J]. Nat Commun, 2017, 8: 15080. DOI: 10.1038/ncomms15080.

[6] YIN W, PING Y F, LI F, *et al*. A map of the spatial distribution and tumour-associated macrophage states in glioblastoma and grade 4 IDH-mutant astrocytoma[J]. J Pathol, 2022, 258(2): 121-135. DOI: 10.1002/path.5984.

[7] 刘庆,杨莹,安乐乐,等. PTPRZ1单克隆抗体对胶质瘤干细胞自我更新和侵袭的抑制作用[J]. 陆军军医大学学报, 2023, 28(12). DOI: 10.16016/j.2097-0927.202308042.
LIU Q, YANG Y, AN L L, *et al*. Inhibiting and invasive self-renewal effect of PTPRZ1 monoclonal antibody on glioma stem cells[J]. J Army Medical University, 2023, 45(24):2530-2536. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202308042.

[8] GANGOSO E, SOUTHGATE B, BRADLEY L, *et al*. Glioblastomas acquire myeloid-affiliated transcriptional programs via epigenetic immunoediting to elicit immune evasion[J]. Cell, 2021, 184(9): 2454-2470.e26. DOI: 10.1016/j.cell.2021.03.023.

[9] GROVER A, SANSEVIERO E, TIMOSENKO E, *et al*. Myeloid-derived suppressor cells: a propitious road to clinic[J]. Cancer Discov, 2021, 11(11): 2693-2706. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-0764.

[10] WANG G Q, ZHONG K H, WANG Z, *et al*. Tumor-associated microglia and macrophages in glioblastoma: from basic insights to therapeutic opportunities[J]. Front Immunol, 2022, 13: 964898. DOI: 10.3389/fimmu.2022.964898.

[11] ZHOU W C, KE S Q, HUANG Z, *et al*. Periostin secreted by glioblastoma stem cells recruits M2 tumour-associated macrophages and promotes malignant growth[J]. Nat Cell Biol, 2015, 17(2): 170-182. DOI: 10.1038/ncb3090.

[12] TAO W W, CHU C W, ZHOU W C, *et al*. Dual role of WISP1 in maintaining glioma stem cells and tumor-supportive macrophages in glioblastoma[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 3015. DOI: 10.1038/s41467-020-16827-z.

[13] HIPPE A, BRAUN S A, OLÁH P, *et al*. EGFR/Ras-induced CCL20 production modulates the tumour microenvironment[J]. Br J Cancer, 2020, 123(6): 942-954. DOI: 10.1038/s41416-020-0943-2.

[14] KADOMOTO S, IZUMI K, MIZOKAMI A. The CCL20-CCR6 axis in cancer progression[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(15): 5186. DOI: 10.3390/ijms21155186.

[15] WANG D, YANG L, YU W N, *et al*. Colorectal cancer cell-derived CCL20 recruits regulatory T cells to promote chemoresistance via FOXO1/CEBPB/NF-κB signaling[J]. J Immunother Cancer, 2019, 7(1): 215. DOI: 10.1186/s40425-019-0701-2.

[16] XU C C, FAN L N, LIN Y F, *et al*. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal cancer metastasis through miR-1322/CCL20 axis and M2 polarization[J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1980347. DOI: 10.1080/19490976.2021.1980347.

[17] DONG D D, ZHANG G J, YANG J C, *et al*. The role of iron metabolism in cancer therapy focusing on tumor-associated macrophages[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(6): 8028-8039. DOI: 10.1002/jcp.27569.

[18] OVAIS M, GUO M Y, CHEN C Y. Tailoring nanomaterials for targeting tumor-associated macrophages[J]. Adv Mater, 2019, 31(19): e1808303. DOI: 10.1002/adma.201808303.

[19] VAN VLERKEN-YSLA L E, RIOS-DORIA J, MOYNIHAN J, *et al*. Abstract 4779: targeting the CCL20-CCR6 axis as a novel opportunity to stimulataneously modulate cancer stem cells and the tumor-immune infiltrate by a dual anti-cancer mechanism[J]. Cancer Res, 2017, 77(13_Supplement): 4779. DOI: 10.1158/1538-7445.am2017-4779.

[20] 郑文静,张瀚,霍毅,等. 巨噬细胞吞噬检查点阻断在抗肿瘤免疫治疗中的应用[J/OL]. 空军军医大学学报. [2024-03-05]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1526.R.20240129.1508.004.html.
ZHENG W J, ZHANG H, HUO Y, *et al*. Application of macrophage phagocytic checkpoint blockade in anti-tumor immunotherapy[J]. J Air Force Med Univ, [2024-03-05]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1526.R.20240129.1508.004.html.

(**收稿**:2024-01-19;**修回**:2024-02-19)

(编辑 张艺霖)