

TGF- β 对膀胱癌组织中巨噬细胞来源肿瘤相关成纤维细胞的影响及其机制

蒲石¹ 沈成全¹ 胡鼎¹ 赵新钊¹ 秦瑞泽¹ 刘昌学¹ 王永华^{1,2}

(1 青岛大学附属医院泌尿外科, 山东 青岛 266003; 2 青岛市泌尿系统疾病临床医学研究中心)

[摘要] 目的 探讨 TGF- β 对膀胱癌组织中巨噬细胞来源肿瘤相关成纤维细胞(CAF)的影响及其机制。方法 采用 Kaplan-Meier 法分析膀胱癌组织中 α -SMA⁺CD68⁺CAF 表达水平与患者的总生存率(OS)的关系;采用免疫荧光技术检测 α -SMA⁺CD68⁺CAF 在膀胱癌组织中的浸润情况;采用 Western blot 实验检测 TGF- β 对 α -SMA⁺CD68⁺CAF 体外诱导作用。同时构建膀胱癌小鼠模型,采用免疫荧光技术和免疫组化法检测 TGF- β 对膀胱癌小鼠体内 α -SMA⁺CD68⁺CAF 的诱导作用及对 CD8⁺T 细胞浸润的影响。结果 膀胱癌组织中 α -SMA 与 CD68 的表达呈正相关,且 α -SMA⁺CD68⁺CAF 高表达的患者预后更差($\chi^2=9.05, P<0.05$)。免疫荧光技术检测结果显示,膀胱癌组织中存在 α -SMA⁺CD68⁺CAF。Western blot 实验检测结果显示,TGF- β 可显著促进 α -SMA⁺CD68⁺CAF 的生成。膀胱癌小鼠模型体内实验显示,TGF- β 可促进膀胱癌组织中 α -SMA⁺CD68⁺CAF 的生成,从而抑制 CD8⁺T 细胞的浸润。结论 TGF- β 可显著促进膀胱癌组织中巨噬细胞来源 CAF 的生成,从而抑制 CD8⁺T 细胞的浸润。

[关键词] 转化生长因子 β ; 癌相关成纤维细胞; 膀胱肿瘤; 肿瘤相关巨噬细胞; 免疫耐受; CD8 阳性 T 淋巴细胞; 细胞浸润

[中图分类号] R737.14

[文献标志码] A

Effect and mechanism of TGF- β on macrophage-derived cancer-associated fibroblasts in bladder cancer tissue PU Shi, SHEN Chengquan, HU Ding, ZHAO Xinzhao, QIN Ruize, LIU Changxue, WANG Yonghua (Department of Urology, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect and mechanism of TGF- β on macrophage-derived cancer-associated fibroblasts (CAFs) in bladder cancer tissue. **Methods** The Kaplan-Meier method was used to investigate the relationship between the expression of α -SMA⁺CD68⁺CAF and overall survival (OS) in bladder cancer; immunofluorescence assay was used to observe the infiltration of α -SMA⁺CD68⁺CAF in bladder cancer tissue; Western blot was used to observe the inductive effect of TGF- β on α -SMA⁺CD68⁺CAF *in vitro*. A mouse model of bladder cancer was established, and immunofluorescence assay and immunohistochemistry were used to observe the inductive effect of TGF- β on α -SMA⁺CD68⁺CAF and its effect on the infiltration of CD8⁺T cells in mice with bladder cancer. **Results** The expression of α -SMA was positively correlated with that of CD68 in bladder cancer tissue, and the patients with a high expression level of α -SMA⁺CD68⁺CAF tended to have a poorer prognosis ($\chi^2=9.05, P<0.05$). Immunofluorescence assay showed the presence of α -SMA⁺CD68⁺CAF in bladder cancer tissue, and Western blot showed that TGF- β could significantly promote the production of α -SMA⁺CD68⁺CAF. *In vivo* experiments in a mouse model of bladder cancer showed that TGF- β promoted the generation of α -SMA⁺CD68⁺CAF in bladder cancer tissue, thereby inhibiting the infiltration of CD8⁺T cells. **Conclusion** TGF- β can significantly promote the production of macrophage-derived CAF in bladder cancer tissue, thereby inhibiting the infiltration of CD8⁺T cells.

[KEY WORDS] Transforming growth factor beta; Cancer-associated fibroblasts; Urinary bladder neoplasms; Tumor-associated macrophages; Immune tolerance; CD8-positive T-lymphocytes; Cell infiltration

随着近年来肿瘤免疫治疗的兴起,以 PD-1/PD-L1 为代表的免疫检查点抑制剂在肿瘤免疫治疗中取得了良好的效果,但对于晚期膀胱癌患者存在着免疫治疗反应低及耐药等问题,限制了其在临床中的应用^[1]。既往研究发现膀胱癌免疫治疗耐药的产生与免疫抑制肿瘤微环境的形成有关^[2],而肿瘤相

关成纤维细胞(CAF)是免疫抑制肿瘤微环境形成的重要因素之一^[3],但膀胱癌中 CAF 的具体来源尚不清楚。近年来在肿瘤微环境中发现了表达成纤维标志物的肿瘤相关巨噬细胞(TAM)^[4-6]。本课题组前期研究发现转化生长因子- β (TGF- β)、TAM、CAF 与膀胱癌患者免疫治疗耐药密切相关^[7-8],由此推测 TGF- β 可通过诱导 TAM 向 CAF 转化,参与膀胱癌免疫治疗耐药性的产生。本研究通过体内外实验观察膀胱癌组织中 TGF- β 对巨噬细胞来源

[收稿日期] 2024-02-29; **[修订日期]** 2024-05-24

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81772713)

[通讯作者] 王永华, Email: wangyonghua@qdu.edu.cn

的 CAF 的影响,探讨膀胱癌中 TAM 向 CAF 转化的相关机制。

1 材料与方法

1.1 膀胱癌组织中 α -SMA 与 CD68 表达相关性及其 Kaplan-Meier(K-M)生存曲线分析

通过 TCGA-BLCA 数据库 (<https://portal.gdc.cancer.gov/>)收集膀胱癌患者的临床信息,以及膀胱癌组织中 α -SMA 与 CD68 mRNA 的表达水平,并通过 Spearman 方法分析 α -SMA 与 CD68 表达水平的相关性。根据 CD68 高表达膀胱癌组织中的 α -SMA 表达水平将患者分为高、低表达组,采用 K-M 法分析 α -SMA⁺CD68⁺CAF 表达水平与患者的总生存率(OS)的关系。

1.2 仪器与试剂

鼠源性膀胱癌细胞 MB49 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。12 只 4 周龄的 C57B16/N 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司。 α -SMA、CD68、CD8、GAPDH 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司,TGF- β 、重组小鼠巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)购自上海 MedChemExpress LLC,十二烷基硫酸钠(SDS)裂解液、二喹啉甲酸(BCA)试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,HRP 偶联二抗购自美国 Jackson Immuno Research 公司。FITC、PE 抗体购自艾博抗(上海)贸易有限公司。荧光显微镜购买于美国 Olympus life science 公司, EVOS[®] FL Auto 显微镜购买于加拿大 Thermo Fisher 公司。

1.3 临床样本的收集

收集 2023 年 5 月—2023 年 8 月于青岛大学附属医院泌尿外科行全膀胱切除术的 10 例患者的膀胱癌组织及其正常膀胱组织,正常膀胱组织距癌灶边缘 5 cm 以上。随后将提取的膀胱癌组织及正常膀胱组织经脱水、石蜡包埋后制成 5 μ m 厚的石蜡切片。患者术前均未接受过新辅助化疗、放疗或免疫治疗。

1.4 小鼠骨髓源性巨噬细胞(BMDM)向 CAF 的转化诱导

4 周龄 C57B16/N 小鼠脱颈处死后,用 1 mL 注射器从其胫骨、股骨和髌骨骨髓腔中抽取骨髓和细胞混合液,离心后收集骨髓细胞。将骨髓细胞接种于含有 10% 热灭活胎牛血清(FBS)和含 50 μ g/L M-CSF 的 DMEM/F12 培养基中,培养 7 d 后,按照相关文献报道的方法^[9],通过流式细胞术检测细胞

中 CD68⁺巨噬细胞的浓度,当超过 95% 的细胞为 CD68⁺细胞时,则认为 BMDM 培养成功。

将 BMDM 细胞接种于 24 孔板中,分为对照组和 TGF- β 组,TGF- β 组中每孔加入含 10% FBS 及 5 μ g/L TGF- β 的 DMEM 培养基 150 μ L,对照组中每孔加入含 10% FBS 以及 PBS 的 DMEM 培养基 150 μ L,将 24 孔板置于 37 $^{\circ}$ C 含体积分数 0.05 的 CO₂ 恒温培养箱中继续培养 5 d,用于后续实验。

1.5 Western blot 实验检测 BMDM 细胞中 α -SMA 蛋白表达量

取培养 5 d 后的上述两组 BMDM 细胞,吸出 24 孔板中的原培养液,每孔加入 1 mmol/L SDS 裂解液裂解细胞,收集细胞悬液并 12 000 r/min 离心 30 min,分离上清液,使用 BCA 试剂盒检测各样本中的蛋白浓度。使用 PAGE 凝胶快速制备试剂盒制备 SDS-PAGE 凝胶,每孔上样 20 μ L 蛋白样品后,80 V 电泳 30 min,120 V 电泳 1 h,随后 290 mA 转膜 1.5 h。室温牛奶封闭 2 h,将膜与 α -SMA 一抗(1 : 4 000)4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。次日再将膜与 HRP 偶联二抗(1 : 10 000)室温孵育 1 h。洗膜后用增强化学发光试剂盒显影。采用 Image J 软件检测各个条带的灰度值,以 GAPDH(1 : 10 000)为内参,计算各目的蛋白的相对表达量。实验重复 3 次,结果取均值。

1.6 膀胱癌小鼠模型的建立

将 12 只 C57BL/6N 小鼠在 25 $^{\circ}$ C 下适应性饲养 7 d,取密度 1×10^{10} 个/L 的鼠源性膀胱癌细胞 MB49 细胞悬液 500 μ L,皮下接种于小鼠左腹股沟,将小鼠随机分为对照组与实验组,每组 6 只。当接种部位出现肉眼可见的肿瘤时,实验组小鼠尾静脉注射含 5 μ g/L TGF- β 的 PBS 100 μ L,对照组小鼠尾静脉注射等体积 PBS,两组小鼠均每 2 d 注射一次。饲养至第 30 天时麻醉后处死两组小鼠,完整剥离出肿瘤组织,置于 4% 甲醛中固定,依次经脱水、石蜡包埋后制成 5 μ m 厚的石蜡切片。

1.7 免疫荧光技术检测膀胱癌患者及小鼠组织切片中的 α -SMA、CD68 表达

将膀胱癌患者的肿瘤组织和正常组织石蜡切片,以及小鼠肿瘤组织的石蜡切片 60 $^{\circ}$ C 下烘烤 2 h,经二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水、蒸馏水水化后,置于抗原修复液中高压煮沸 20 min,并以 1% ABS 封闭 1 h。将切片分别与稀释以后的 α -SMA(1 : 400)、CD68(1 : 400)一抗在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。次日室温下与荧光二抗孵育 1 h,使用 DAPI 染色剂染色细胞

核。最后加入抗荧光淬灭剂,甘油封片,使用 Olympus 荧光显微镜观察 α -SMA、CD68 的荧光染色情况,并用 Image J 软件计算 α -SMA⁺ CD68⁺ 细胞占比(每个视野下 α -SMA⁺ CD68⁺ 双阳性细胞数与总细胞数的比值)。实验重复 3 次,结果取均值。

1.8 免疫组化检测小鼠切片组织中 α -SMA、CD8 的表达

将小鼠肿瘤组织石蜡切片依次经脱蜡、水化等处理以后,置于柠檬酸钠抗原修复液(0.01 mol/L, pH 6)当中加热 20 min,冷却至室温后,用 3% 牛血清白蛋白(BSA)封闭 30 min。将切片分别与 α -SMA(1:200)、CD8(1:10 000)一抗 4 °C 下孵育过夜,第 2 天室温下与同种属的二抗孵育 30 min, DAB 显色后,用苏木素染色剂染色细胞核,脱水封片。使用 EVOS © FL Auto 显微镜观察切片染色情况并拍照,统计每个视野下 α -SMA⁺ 细胞数目与 CD8⁺ T 细胞数目。实验重复 3 次,结果取均值。

1.9 流式细胞术检测 BMDM 细胞中 α -SMA、CD68 表达

取培养 5 d 的两组 BMDM 细胞,置于离心管中以 1 000 r/min 离心 15 min,随后以 PBS 缓冲液重悬细胞,再以 1 000 r/min 离心 15 min,弃去上清

液,随后在每管中加入 300 μ L 上样缓冲液重悬,再依次加入 5 μ L FITC(阳性表示 α -SMA⁺)和 10 μ L PE(阳性表示 CD68⁺)染色液。最后使用流式细胞仪分析并计算 α -SMA⁺ CD68⁺ 细胞在 BMDM 细胞中的占比。

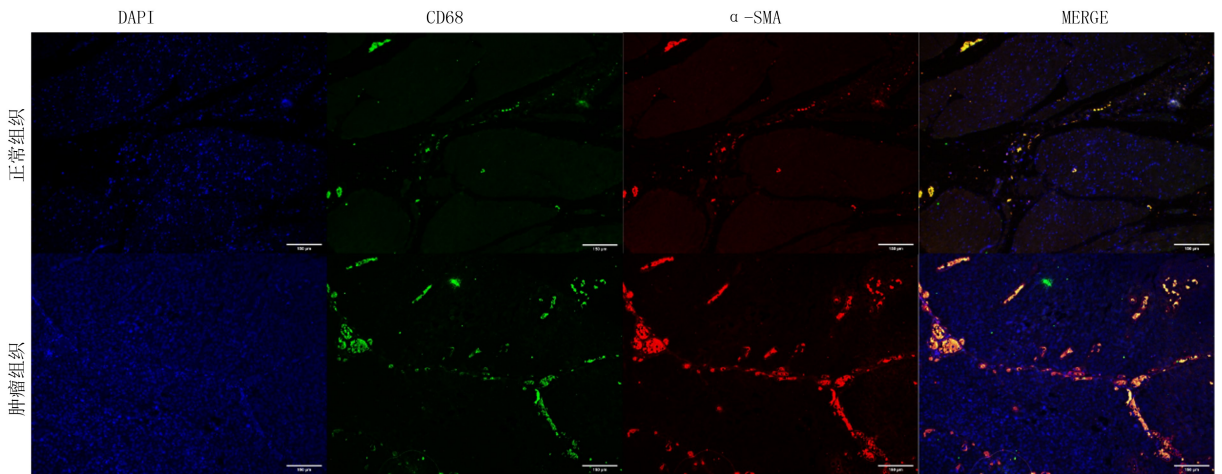
2 结 果

2.1 α -SMA⁺ CD68⁺ 与膀胱癌患者预后的相关性

对 TCGA 数据库相关数据分析显示,膀胱癌患者肿瘤组织中 CAF 标记物 α -SMA 和 TAM 标记物 CD68 的表达呈正相关($R=0.24, P<0.05$)。K-M 生存曲线分析结果显示, α -SMA⁺ CD68⁺ 高表达组患者 OS 明显低于 α -SMA⁺ CD68⁺ 低表达组($\chi^2=9.05, P<0.05$)。

2.2 α -SMA⁺ CD68⁺ 细胞在膀胱癌患者肿瘤组织中的浸润情况

免疫荧光染色结果显示,膀胱癌患者的肿瘤组织当中存在 CAF 标记物 α -SMA⁺ 和 TAM 标记物 CD68⁺ 共定位表达的现象,正常组织和肿瘤组织中 α -SMA⁺ CD68⁺ 细胞占比分别为(0.33 \pm 0.18)%、(2.84 \pm 1.45)%,差异有统计学意义($t=2.971, P<0.05$)。见图 1。



蓝色为细胞核,绿色为 CD68,红色为 α -SMA, MERGE 为混合图像,免疫荧光染色,100 倍

图 1 α -SMA⁺ CD68⁺ 细胞在膀胱癌患者肿瘤组织中的浸润情况

2.3 TGF- β 对 α -SMA⁺ CD68⁺ 细胞体外诱导作用

Western blot 实验的检测结果显示,对照组和 TGF- β 组 BMDM 细胞中 α -SMA 蛋白相对表达量为分别为 0.01 \pm 0.01、0.69 \pm 0.08,差异有统计学意义($t=15.41, P<0.05$)。见图 2。流式细胞术检测结果显示, TGF- β 组中 α -SMA⁺ CD68⁺ 细胞占比明显高于对照组。见图 3。

2.4 TGF- β 对膀胱癌小鼠体内 α -SMA⁺ CD68⁺ 细

胞的诱导作用及对 CD8⁺ T 细胞浸润的影响

免疫荧光染色结果显示,对照组以及实验组小鼠肿瘤组织当中 α -SMA⁺ CD68⁺ 细胞占比分别为(1.33 \pm 1.10)%、(23.25 \pm 9.15)%,差异有统计学意义($t=4.120, P<0.05$)。见图 4。切片免疫组化染色结果显示,对照组和实验组小鼠肿瘤组织中每个视野下 α -SMA⁺ 细胞数目分别为(10.74 \pm 5.46)、(40.93 \pm 6.87)个,差异具有统计学意义($t=8.432,$

$P < 0.05$), 对照组和实验组的肿瘤组织中每视野下 $CD8^+$ T 细胞数目分别为 (61.81 ± 11.25) 、 (10.07 ± 5.54) 个, 差异有统计学意义 ($t = 10.10, P < 0.05$)。见图 5。

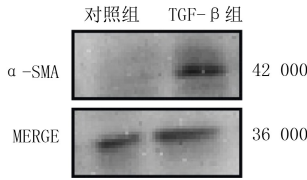


图 2 两组 BMDM 细胞中 α -SMA 蛋白表达水平

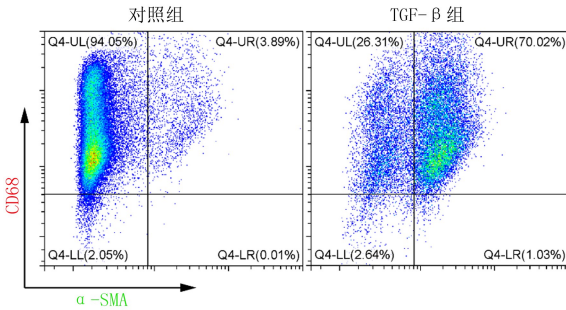


图 3 流式细胞术检测两组 BMDM 细胞中 α -SMA⁺ CD68⁺ 细胞表达水平

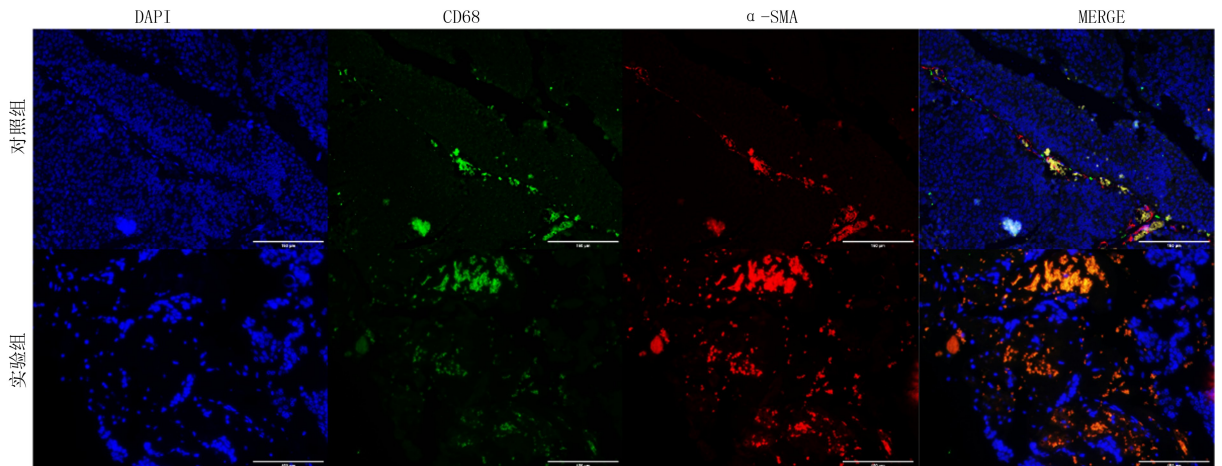
3 讨 论

肿瘤微环境是目前影响肿瘤治疗的主要因素之一^[10], CAF 是肿瘤微环境中最丰富的基质细胞类型, 具有高度异质性和多功能性^[11-13], 其与肿瘤的恶性进展、侵袭转移以及不良预后密切相关^[14-16]。有研究表明 CAF 可通过增强肿瘤微环境中细胞外基质(ECM)的硬度从而阻碍免疫细胞的浸润^[17-18]。此外 CAF 还可通过释放细胞因子促进血管生成以加快肿瘤的恶性进展^[19]。因此, 深入探索 CAF 的形成分化、分子分型以及其在肿瘤免疫抑制微环境形成中的作用, 对于阐明膀胱癌免疫治疗耐药性的

机制, 克服膀胱癌免疫治疗目前面临的反应性低、耐药性等瓶颈问题具有重要意义。

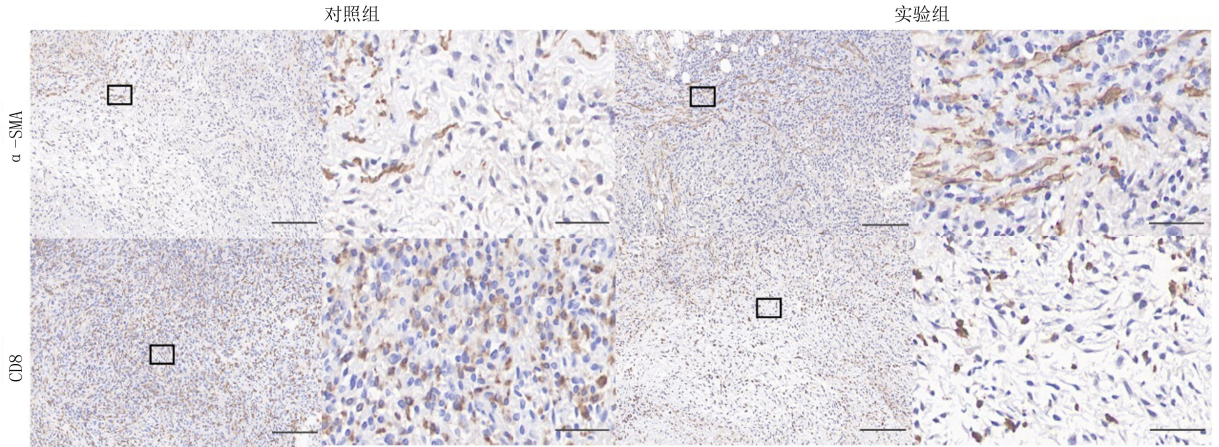
本研究通过 TCGA 数据库分析巨噬细胞标志物 $CD68$ 与成纤维细胞标志物 α -SMA 之间的相关性, 并检测临床样本中两种标志物的表达情况, 结果发现在膀胱癌组织中 α -SMA 表达与 $CD68$ 表达存在正相关, 且在膀胱癌肿瘤组织中 α -SMA、 $CD68$ 共定位表达现象明显高于正常膀胱组织, 提示在膀胱癌肿瘤微环境中存在巨噬细胞来源的 CAF 细胞, 即 α -SMA⁺ $CD68^+$ CAF 细胞, 目前已被证实肿瘤微环境中的 CAF 来源于多种细胞途径, 如内皮间充质转化、上皮间充质转化等^[20]。CHEN 等^[21] 研究显示, TGF- β 可加快肾脏纤维化的进展, 而骨髓源性巨噬细胞是纤维化中成纤维细胞的主要来源^[22-23]。研究发现在肺癌和神经母细胞瘤中 TAM 与 CAF 水平显著相关^[4], 临床上, 巨噬细胞标志物的 CAF 也被认为是口腔鳞状细胞癌患者预后不良的指标^[24], 这提示 α -SMA⁺ $CD68^+$ CAF 细胞可能在肿瘤微环境中发挥重要作用, 但对于 α -SMA⁺ $CD68^+$ CAF 细胞的具体作用机制及相关信号通路目前尚不清楚。

为了进一步研究 α -SMA⁺ $CD68^+$ CAF 细胞对肿瘤微环境的影响以及相关的信号通路, 本研究通过 TGF- β 干预 BMDM 细胞的方式来尝试体外诱导 α -SMA⁺ $CD68^+$ CAF 细胞生成, 通过 Western blot 方法检测 α -SMA 蛋白表达水平, 结果发现 TGF- β 干预后 BMDM 细胞中 α -SMA 蛋白的表达水平明显上调, 这提示 TGF- β 可能在诱导 α -SMA⁺ $CD68^+$ CAF 细胞生成过程中发挥作用。本研究的流式细胞术检测结果显示, TGF- β 干预后 α -SMA⁺ $CD68^+$ CAF 细胞数明显多于对照组。上述结果提示 TGF- β 可以明显促进 α -SMA⁺ $CD68^+$ CAF 细胞的生成。



蓝色为细胞核, 绿色为 $CD68$, 红色为 α -SMA, MERGE 为混合图像, 免疫荧光染色, 100 倍

图 4 免疫荧光技术检测小鼠肿瘤组织中 α -SMA⁺ $CD68^+$ 细胞表达水平



棕色为 α -SMA⁺ 和 CD8⁺ T 细胞, 蓝色为细胞核, 免疫组化染色; 左侧放大倍数 100 倍, 右下角 bar 代表 50 μ m, 右侧为左侧黑框区域的局部放大(400 倍), 右下角 bar 代表 150 μ m

图 5 小鼠肿瘤组织中 α -SMA 表达及 CD8⁺ T 细胞浸润情况

TGF- β /Smad3 通路是骨髓源性巨噬细胞向成纤维细胞转化的重要通路^[25]。TGF- β /Smad3 信号传导的失调与肿瘤发生和纤维化显著相关, 该通路可将成纤维细胞重编程从而导致 CAF 活化^[26], 其主要通过调节 ECM 积累和 CAF 活化来发挥促肿瘤作用^[22]。TANG 等^[9]通过单细胞测序研究发现, 在非小细胞肺癌中, Smad3 可通过 TGF- β /Smad3 通路促进巨噬细胞来源的 CAF 生成, 并通过促进 ECM 及新生血管生成来加速肿瘤的发生发展。此外, TGF- β 还可通过抑制免疫细胞的功能参与肿瘤免疫抑制微环境的形成^[27]。本研究通过构建膀胱癌小鼠模型来验证 TGF- β 对于 α -SMA⁺ CD68⁺ CAF 细胞生成及免疫微环境的影响, 通过免疫荧光技术检测小鼠肿瘤组织中 α -SMA 与 CD68 的共定位表达情况, 结果发现加入 TGF- β 后, 小鼠肿瘤组织中 α -SMA⁺ CD68⁺ CAF 细胞明显增多, 这进一步说明 TGF- β 促进了 α -SMA⁺ CD68⁺ CAF 细胞的生成。研究显示, CAF 通过分泌 ECM 形成物理屏障, 进而阻碍免疫细胞(如 T 细胞)浸润, 以及参与免疫抑制微环境的形成^[28], 而 TGF- β 是促进肿瘤微环境当中 CAF 生成的关键信号通路^[9]。本研究通过给予膀胱癌小鼠 TGF- β 处理并通过免疫组化检测 α -SMA 与 CD8⁺ T 细胞染色情况, 结果发现 TGF- β 的干预促进了小鼠肿瘤组织中 α -SMA⁺ 细胞的生成, 同时还抑制了小鼠肿瘤组织中 CD8⁺ T 细胞的浸润, 提示 TGF- β 可通过促进 α -SMA⁺ CD68⁺ CAF 生成, 来抑制免疫细胞浸润, 从而参与免疫抑制微环境的形成。

总之, 本研究在膀胱癌肿瘤微环境中检测到了 α -SMA⁺ CD68⁺ CAF 细胞, 并揭示了 TGF- β 参与免

疫抑制肿瘤微环境形成的机制, 可能是通过促进 α -SMA⁺ CD68⁺ CAF 的生成, 进一步抑制了免疫细胞的浸润。本研究有助于进一步阐明膀胱癌免疫治疗的耐药机制, 为抑制膀胱癌免疫治疗耐受提供了数据参考。

伦理批准和知情同意: 本研究涉及的所有试验均已通过青岛大学附属医院伦理委员会的审核批准(文件号 QYFYWZLL28770)。所有研究过程均遵照《赫尔辛基宣言》的规定进行。受试对象或其亲属已经签署知情同意书。

伦理批准和动物权利声明: 本研究涉及的所有动物实验均已通过青岛大学医学伦理委员会的审核批准(文件号 20230714C571820230-905032)。所有实验过程均遵照《实验动物管理条例》的规定进行。

作者声明: 蒲石、王永华参与了研究设计; 所有作者均参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文, 且均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] CRISPEN P L, KUSMARTSEV S. Mechanisms of immune evasion in bladder cancer[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2020, 69(1): 3-14.
- [2] MARIATHASAN S, TURLEY S J, NICKLES D, et al. TGF- β attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells[J]. *Nature*, 2018, 554(7693): 544-548.
- [3] DESBOIS M, WANG Y L. Cancer-associated fibroblasts: Key players in shaping the tumor immune microenvironment[J]. *Immunol Rev*, 2021, 302(1): 241-258.
- [4] KRAMAN M, BAMBROUGH P J, ARNOLD J N, et al. Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein- α [J]. *Science*, 2010, 330(6005): 827-830.
- [5] ARNOLD J N, MAGIERA L, KRAMAN M, et al. Tumoral immune suppression by macrophages expressing fibroblast ac-

- tivation protein- α and heme oxygenase-1[J]. *Cancer Immunol Res*, 2014,2(2):121-126.
- [6] MULIADITAN T, CARON J, OKESOLA M, et al. Macrophages are exploited from an innate wound healing response to facilitate cancer metastasis[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):2951.
- [7] SHEN C Q, LIU J, JIAO W, et al. A feed-forward loop based on aerobic glycolysis and TGF- β between tumor-associated macrophages and bladder cancer cells promoted malignant progression and immune escape[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2023,149(14):12867-12880.
- [8] ZHANG Z, YU Y B, ZHANG Z L, et al. Cancer-associated fibroblasts-derived CXCL12 enhances immune escape of bladder cancer through inhibiting P62-mediated autophagic degradation of PDL1[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2023,42(1):316.
- [9] TANG P C, CHUNG J Y, XUE V W, et al. Smad3 promotes cancer-associated fibroblasts generation via macrophage-myofibroblast transition[J]. *Adv Sci*, 2022,9(1):e2101235.
- [10] BINNEWIES M, ROBERTS E W, KERSTEN K, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy[J]. *Nat Med*, 2018,24(5):541-550.
- [11] DASARI S, FANG Y M, MITRA A K. Cancer associated fibroblasts: Naughty neighbors that drive ovarian cancer progression[J]. *Cancers*, 2018,10(11):406.
- [12] TAO L L, HUANG G C, SONG H Z, et al. Cancer associated fibroblasts: An essential role in the tumor microenvironment [J]. *Oncol Lett*, 2017,14(3):2611-2620.
- [13] CHEN X M, SONG E W. Turning foes to friends: Targeting cancer-associated fibroblasts[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(2):99-115.
- [14] LAVIE D, BEN-SHMUEL A, EREZ N, et al. Cancer-associated fibroblasts in the single-cell era[J]. *Nat Cancer*, 2022,3(7):793-807.
- [15] RIMAL R, DESAI P, DAWARE R, et al. Cancer-associated fibroblasts: Origin, function, imaging, and therapeutic targeting[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2022,189:114504.
- [16] KILVAER T K, KHANEHKNARI M R, HELLEVIK T, et al. Cancer associated fibroblasts in stage I – III A NSCLC: Prognostic impact and their correlations with tumor molecular markers[J]. *PLoS One*, 2015,10(8):e0134965.
- [17] CORONA A, BLOBE G C. The role of the extracellular matrix protein TGFBI in cancer [J]. *Cell Signal*, 2021, 84:110028.
- [18] MAO X Q, XU J, WANG W, et al. Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: New findings and future perspectives[J]. *Mol Cancer*, 2021,20(1):131.
- [19] DERYUGINA E I, QUIGLEY J P. Tumor angiogenesis: MMP-mediated induction of intravasation- and metastasis-sustaining neovasculature[J]. *Matrix Biol*, 2015,44-46:94-112.
- [20] RÄSÄNEN K, VAHERI A. Activation of fibroblasts in cancer stroma[J]. *Exp Cell Res*, 2010,316(17):2713-2722.
- [21] CHEN J Z, TANG Y, ZHONG Y, et al. P2Y12 inhibitor clopidogrel inhibits renal fibrosis by blocking macrophage-to-myofibroblast transition[J]. *Mol Ther*, 2022, 30(9):3017-3033.
- [22] LEBLEU V S, TADURI G, O'CONNELL J, et al. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis[J]. *Nat Med*, 2013,19(8):1047-1053.
- [23] ZHOU Y Y, LI Z L, YU S Y, et al. Igaratimod prevents renal fibrosis in unilateral ureteral obstruction model mice by suppressing M2 macrophage infiltration and macrophage-myofibroblast transition[J]. *Ren Fail*, 2024,46(1):2327498.
- [24] ZHAO X X, DING L, LU Z Y, et al. Diminished CD68⁺ cancer-associated fibroblast subset induces regulatory T-cell (treg) infiltration and predicts poor prognosis of oral squamous cell carcinoma patients[J]. *Am J Pathol*, 2020,190(4):886-899.
- [25] SEMENZA G L. Cancer-stromal cell interactions mediated by hypoxia-inducible factors promote angiogenesis, lymphangiogenesis, and metastasis[J]. *Oncogene*, 2013,32(35):4057-4063.
- [26] GARRISON G, HUANG S K, OKUNISHI K, et al. Reversal of myofibroblast differentiation by prostaglandin E(2)[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013,48(5):550-558.
- [27] BATLLE E, MASSAGUÉ J. Transforming growth factor- β signaling in immunity and cancer[J]. *Immunity*, 2019,50(4):924-940.
- [28] BIFFI G, TUVESON D A. Diversity and biology of cancer-associated fibroblasts[J]. *Physiol Rev*, 2021,101(1):147-176.
- (本文编辑 耿波)
- (上接第 202 页)
- [21] LAURETTI E, DINCER O, PRATICO D. Glycogen synthase kinase-3 signaling in Alzheimer's disease[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2020,1867(5):118664.
- [22] PEINEAU S, BRADLEY C, TAGHIBIGLOU C, et al. The role of GSK-3 in synaptic plasticity[J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 153(Suppl 1):S428-S437.
- [23] TAO W W, YAO G D, YUE Q Y, et al. 14-3-3 ζ Plays a key role in the modulation of neuroplasticity underlying the antidepressant-like effects of Zhi-Zi-Chi-Tang [J]. *Phytomedicine*, 2023,116:154888.
- [24] CASTANO A, SILVESTRE M, WELLS C I, et al. Discovery and characterization of a specific inhibitor of serine-threonine kinase cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) demonstrates role in hippocampal CA1 physiology [J]. *Elife*, 2023, 12:e88206.
- (本文编辑 耿波)