

• 专题研究:肿瘤 •

肿瘤相关成纤维细胞分泌THBS2通过PI3K/AKT通路驱动巨噬细胞M2极化促进结直肠癌进展

徐 甲, 厉梦琪, 袁小琴*

南京医科大学基础医学院人体解剖学系, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的: 探究肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblast, CAF)通过分泌血小板反应蛋白-2(thrombospondin-2, THBS2)促进巨噬细胞M2极化的作用及机制。方法: 基于癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库分析结肠腺癌中THBS2的表达特征和临床意义; 通过TISCH2单细胞数据库及多重免疫组化染色定位THBS2细胞来源, 结合TIMER2.0评估其与免疫浸润相关性; 利用Western blot、ELISA及原代CAF模型验证THBS2分泌特征; 通过qRT-PCR、Transwell及PI3K/AKT通路检测评估THBS2对巨噬细胞极化、迁移及信号通路的调控。结果: THBS2在结肠癌肿瘤组织中高表达, 与晚期TNM分期及患者不良预后密切相关。单细胞测序及实验证明THBS2特异性来源于CAF, 与M2型巨噬细胞浸润呈强正相关。功能实验显示, CAF条件培养基显著上调巨噬细胞M2标志物[白细胞介素(interleukin, IL)-10、巨噬细胞甘露糖受体(macrophage mannose receptor, MMR)、CD206、精氨酸酶1(arginase-1, ARG1), 并促进迁移; 重组蛋白THBS2激活PI3K/AKT通路, 促进巨噬细胞M2极化, 而THBS2敲低后极化及迁移效应被逆转。结论: CAF来源的THBS2可能通过激活PI3K/AKT信号通路诱导巨噬细胞向M2极化及迁移, 从而促进结直肠癌免疫微环境重塑, 为靶向结直肠癌CAF-THBS2轴的免疫治疗提供了实验依据。

[关键词] 肿瘤相关成纤维细胞; THBS2; 巨噬细胞极化

[中图分类号] R735.34

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2026)01-1-13

doi: 10.7655/NYDXBNSN250405

THBS2 secretion by cancer-associated fibroblasts drives macrophage M2 polarization via the PI3K/AKT signaling pathway to promote colorectal cancer progression

XU Jia, LI Mengqi, YUAN Xiaoqin*

Department of Human Anatomy, School of Basic Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of cancer-associated fibroblast (CAF) in promoting M2 polarization of macrophages by secreting thrombospondin-2 (THBS2). **Methods:** The expression and clinical significance of THBS2 in colorectal adenocarcinoma were analyzed using the TCGA database. The cellular origin of THBS2 was identified through the TISCH2 single-cell database combined with multiplex immunohistochemical staining, and its association with immune infiltration was assessed using TIMER2.0. Western blot, ELISA, and primary CAF models were utilized to validate THBS2 secretion. The regulation of THBS2 on macrophage polarization, migration, and signaling pathways was evaluated by qRT-PCR, transwell assays, and PI3K/AKT pathway analysis. **Results:** THBS2 expression was significantly elevated in colorectal cancer tissues and closely correlated with advanced TNM stages and poor prognosis of patients. Single-cell sequencing and experiments confirmed that THBS2 is specifically derived from CAFs and most strongly associated with M2 macrophage infiltration. Functional experiments demonstrated that CAF-conditioned medium upregulated M2 markers interleukin (IL)-10, macrophage mannose receptor (MMR), CD206, arginase-1 (ARG1) and enhanced macrophage migratory capacity. Recombinant THBS2 promoted p-PI3K/p-AKT phosphorylation levels in macrophages compared to the IL-4 group, augmenting M2 polarization. THBS2 knockdown significantly inhibited these pro-migratory and polarization effects. **Conclusion:** CAF-derived THBS2 may drive macrophage M2 polarization and migration by activating the PI3K/AKT signaling pathway, thereby remodeling the colorectal cancer immune microenvironment and driving malignant progression, which provides experimental evidence for immunotherapy strategies targeting the CAF-THBS2 axis in colorectal cancer.

[基金项目] 国家自然科学基金(81972288)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yuanxq@njmu.edu.cn (ORCID: 0000-0002-3084-5624)

[Key words] cancer-associated fibroblast; THBS2; macrophage polarization

[J Nanjing Med Univ, 2026, 46(01): 1-13]

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)作为全球高负担恶性肿瘤,其发病率和死亡率分别位于全球恶性肿瘤的第3位和第2位^[1]。我国CRC发病率也呈持续攀升态势,现已成为仅次于肺癌的第二大高发肿瘤^[2]。目前临床治疗仍以手术切除联合辅助化疗为主要方案,但转移性CRC患者的5年生存率仍不足20%^[3-4]。因此,系统阐明CRC发生发展的分子机制并探索新型治疗靶点,已成为当前肿瘤研究领域的重要课题。

肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)由免疫细胞、肿瘤相关成纤维细胞、内皮细胞等,以及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)、细胞因子、代谢产物等非细胞成分共同构成的动态生态系统^[5-6]。肿瘤细胞与TME密切相关,不断相互作用^[7-8]。而在TME中,肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblast, CAF)作为关键效应细胞发挥核心调控功能^[9]。CAF通过分泌生长因子[转化生长因子- β (transforming growth factor-beta, TGF- β)、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)]、趋化因子(C-X-C基元)配体12(C-X-C motif chemokine ligand 12, CXCL12)及基质金属蛋白酶-2/9(matrix metalloproteinase-2/9, MMP2/9)等因子促进肿瘤增殖、ECM重塑及免疫逃逸^[10]。因此,针对CAF功能异质性及其分泌因子调控的干预策略,已成为提升现有治疗方案疗效的关键研究方向。

肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage, TAM)是TME中数量最丰富的免疫细胞群,起源于循环单核细胞或局部组织驻留的巨噬细胞^[11]。在肿瘤进展中,TAM通过表型可塑性展现出功能异质性,通常极化为促肿瘤的M2表型^[12],成为肿瘤进展的关键协同者。研究表明,TAM通过分泌生长因子,如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF),表达精氨酸酶-1(arginase-1, ARG1)、程序性死亡配体-1(programmed death-ligand 1, PD-L1)以及基质重塑酶(matrix metalloproteinase, MMP),介导血管生成、T细胞抑制及肿瘤细胞转移^[13],其高浸润与患者不良预后显著相关^[14-15],这使得靶向TAM的极化重编程或特异性耗竭策略成为肿瘤免疫治疗的新兴方向。

血小板反应蛋白-2(thrombospondin-2, THBS2, TSP2)作为血小板反应蛋白家族(thrombospondin family, THBS)的核心成员,是由470 kDa亚基通过二硫键连接形成的同源三聚体分泌型糖蛋白^[16]。通过整合素($\alpha 3\beta 1$ 、 $\alpha 4\beta 1$)和CD36受体调控ECM动态重构、血管生成开关及肿瘤免疫编辑等病理进程^[17]。最新研究表明,THBS2可激活FAK/Src通路促进侵袭^[18],但其调控TME重塑的分子机制仍存在研究盲区。本研究结合生物信息学分析与功能实验,首次揭示CAF通过分泌THBS2激活PI3K/AKT通路诱导巨噬细胞M2极化,为靶向CAF-TAM轴的CRC治疗提供新策略。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

THP-1细胞(中国科学院上海细胞生物研究所);原代正常成纤维细胞(normal fibroblast, NF)、CAF(本实验室分离纯化);胎牛血清(Gibco公司,美国);RPMI 1640培养基、DMEM培养基(上海中乔新舟生物科技有限公司);RNAiso Plus试剂(TaKaRa Bio公司,日本);逆转录试剂盒和SYBR Green Mix试剂(南京诺唯赞生物科技有限公司);佛波酯(phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(Sigma公司,美国);白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)(苏州近岸蛋白质科技股份有限公司);人THBS2重组蛋白(R&D Systems公司,美国);Lipo-Gene™ 2000 Star Transfection Reagent (US EVER-BRIGHT公司,美国);8 μ m孔径Transwell小室(Corning公司,美国);三标四色多重荧光染色试剂盒、Polymer-HRP羊抗兔二抗试剂盒(湖南艾方生物科技有限公司);BCA蛋白浓度检测试剂盒、RIPA裂解液、蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF)、磷酸酶抑制剂(PI)(上海碧云天生物技术股份有限公司);ECL化学发光试剂(南京普诺恩生物科技有限公司);人THBS2 ELISA试剂盒(上海酶联生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

THP-1在含有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养;原代CAF与NF在含有10%胎牛血清的

DMEM 培养基中培养。所有细胞均置于 37 °C、5% CO₂ 的加湿培养箱中培养。

1.2.2 细胞转染

根据 LipoGene™ 2000 转染试剂说明书, 将含有 THBS2 的 siRNA 加入 LipoGene™ 2000 转染溶液中制备 siRNA-脂质体复合物, 室温孵育 20 min, 然后将 siRNA-脂质体复合物加入 CAF 细胞中, 37 °C 培养 6 h 后, 更换为 DMEM 完全培养基, 继续培养 48 h。

1.2.3 条件培养基的收取

将 NF 和 CAF 细胞以 3×10⁵ 个/孔的浓度接种在 6 孔板中。6~8 h 后, 更换为含有 4% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 并于 24 h 后收集细胞上清; 收集转染了 THBS2-siRNA 48 h 后的 CAF 细胞上清。所有上清均用 0.22 μm 滤器过滤, 分装后于 -80 °C 冰箱保存。

1.2.4 巨噬细胞极化诱导实验

THP-1 细胞以 5×10⁵ 个/孔的浓度接种在 24 孔板中, 加入 100 ng/mL PMA 诱导 24 h, 使 THP-1 细胞分化为贴壁巨噬细胞, 按照以下分组进行相关刺激。单一刺激因子组: LPS 组 (100 ng/mL LPS)、IL-4 组 (20 ng/mL IL-4)。条件培养基处理组: NF 上清诱导组 (NF-CM), 将 NF 上清与 RPMI 1640 完全培养基以 1:1 混合; CAF 上清诱导组 (CAF-CM): 将 CAF 上清与 RPMI 1640 完全培养基以 1:1 混合。组合刺激组: THBS2+IL-4 组 (100 ng/mL THBS2+20 ng/mL IL-4); THBS2 + LPS 组 (100 ng/mL THBS2 + 100 ng/mL LPS)。敲低处理组: si-2-CM 组, THBS2 敲低 CAF 上清 1:1 混合 RPMI 1640 培养基; si-3-CM 组: THBS2 敲低 CAF 上清 1:1 混合 RPMI 1640 培养基; si-nc-CM 组: 对照 CAF 上清 1:1 混合 RPMI 1640 培养基。所有分组细胞均在相应处理条件下继续培养 24 h。

1.2.5 巨噬细胞迁移实验

将 2×10⁵ 个 PMA 刺激后的 THP-1 细胞接种于 Transwell 上室, 并使用不同条件培养基 (NF-CM、CAF-CM) 处理, 同 1.2.4 节; 对照组 (PBS) 及 THBS2 组 (100 ng/mL THBS2)、THBS2 敲低 CAF 上清组 (si-2-CM、si-3-CM) 和对照 CAF 上清组 (si-nc-CM) 处理同 1.2.4 节, 对下室进行处理, 36 h 后取出小室进行固定染色, 清洗拍照。

1.2.6 qRT-PCR 实验

分别收集各组细胞, Trizol 法提取总 RNA, 并按试剂盒说明书逆转为 cDNA。随后用 SYBR Green Mix 试剂配制 qRT-PCR 反应体系, 在实时荧光定量 PCR 仪上设定反应程序并进行 PCR 检测。以 β-actin 为内参基因, 采用 2^{-ΔΔCT} 法计算各靶基因的 mRNA 表

达水平, 引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Gene	Primer sequence(5'→3')
β-actin	Forward:TCATGAAGTGTGACGTGGACAT
	Reverse:CTCAGGAGGAGCAATGATCTTG
IL-1β	Forward:AGCTACGAATCTCCGACCAC
	Reverse:CGTTATCCCATGTGTGCAAGAA
IL-6	Forward:GGACAACCTCAGGGATGCAAT
	Reverse:GCAGAAGAGAGCCAACCAAC
TNF-α	Forward:CCTCTCTTAATCAGCCCTCTG
	Reverse:GAGGACCTGGGAGTAGATGAG
IL-10	Forward:AAGCCTGACCACGCTTTCTA
	Reverse:ATGAAGTGGTTGGGAATGA
CD206	Forward:TGACGAATTTGTGGATCGGCT
	Reverse:CCAGTACCCATCCTTGCCCTT
ARG1	Forward:TGGACAGACTAGGAATTGGCA
	Reverse:CCAGTCCGTCAACATCAAAACT
THBS2	Forward:CCGCCTACCGTTTTGTACG
	Reverse:CTGGGCCATTGGACACAATCT

1.2.7 ELISA 实验

收取 CAF 与 NF 培养基上清, 700 g 离心 5 min 去除杂质及细胞碎片, 按照人 THBS2 ELISA 试剂盒说明, 检测 THBS2 的水平。首先, 将 100 μL 捕获抗体加入 96 孔板中, 4 °C 包被过夜, 弃去液体, 洗涤液清洗 3 次。随后将梯度稀释的标准品和待测样本在 37 °C 孵育 1 h。洗涤后每孔加入 50 μL 生物素标记的检测抗体, 室温避光孵育 2 h 洗涤后, 加入 100 μL 链霉亲和素-HRP 工作液, 室温避光孵育 1 h。加入显色液, 室温避光孵育 30 min 后, 用 50 μL 终止液终止反应, 使用酶标仪在 450 nm 处测定样品吸光度。最后, 绘制标准曲线并计算待测样品中 THBS2 的含量。

1.2.8 Western blot 检测

使用配制好的蛋白裂解液 (RIPA:PI:PMSF=100:1:1) 裂解细胞沉淀, 冰上静置 30 min 后 13 000 r/min 4 °C 离心 15 min, 提取蛋白上清并用 BCA 法进行定量, 100 °C 金属浴 5 min, 使蛋白变性后置于 -80 °C 保存。将等量蛋白样本在 10%SDS-PAGE 中电泳, 然后将蛋白转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶在室温封闭 1 h, 加入 PI3K 抗体、p-PI3K 抗体、Akt 抗体、p-Akt 抗体、THBS2 抗体、α-SMA 抗体、FAP 抗体、Vimentin 抗体、GAPDH 抗体、β-actin 抗体, 4 °C 孵育过夜。TBST 洗涤后, 加入相应特异性二抗 (1:10 000), 摇床室温反应 1 h。洗膜后, 滴加 ECL 化学发光液于暗室中显影、曝光。使用 Image J 软件 (Version 1.5.3) 进行定

量分析。

1.2.9 免疫组织化学染色

临床CRC癌组织与癌旁组织来自南京医科大学附属第一医院,伦理批号为(2016)640。将人群样本组织在4%多聚甲醛中固定后制成组织切片,37℃烤箱烘片过夜,行常规脱蜡水化抗原修复,随后用3% H₂O₂阻断内源性过氧化物酶活性15 min,10%羊血清室温封闭1 h,滴加THBS2抗体(1:1 000)4℃过夜。次日复温并清洗后,使用Polymer-HRP羊抗兔二抗试剂盒孵育30 min,DAB显色5 min,再充分清洗、复染、脱水、透明、封片。正置显微镜随机采集5个200倍镜视野,使用Image Plus Pro软件进行分析,计算H-Score。

1.2.10 多重免疫组化染色

将临床组织切片行脱蜡水化与抗原修复后,用3% H₂O₂阻断内源性过氧化物酶活性15 min,10%羊血清室温封闭1 h,再滴加FAP抗体(1:1 000)过夜。次日复温并清洗后,使用Polymer-HRP羊抗兔二抗试剂盒孵育30 min后,再滴加TSA-690荧光染料避光孵育10 min,PBS清洗后,将切片进行抗原修复,重复上述实验步骤,依次孵育THBS2抗体(1:1 000),TSA-570荧光染料。采用DAPI复染细胞核后封片,委托艾方生物公司进行全景荧光扫描用于后续分析。

1.2.11 癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库分析

从TCGA数据平台(<https://cancergenome.nih.gov>)获取结肠腺癌(colon adenocarcinoma, COAD)肿瘤组织和正常结肠组织的转录组表达谱及相应临床数据,数据获取时间为2025年2月,包含39例正常组织、448例原发肿瘤组织,用于分析THBS2在COAD组织与正常组织中的表达差异。此外,通过Kaplan-Meier生存分析评估THBS2表达水平与COAD患者总生存期(overall survival, OS)的相关性。

1.2.12 TISCH2数据库分析

通过TISCH2数据库(<http://TISCH.comp-genomics.org>)获取CRC单细胞数据集GSE166555进行分析,基于UMAP降维可视化结果,通过t-SNE热图展示细胞亚群的聚类分布,并分析基因THBS2在不同细胞亚群中聚类表达。

1.2.13 TIMER2.0数据库分析

使用TIMER2.0数据库(<http://timer.cistrome.org/>)反卷积算法进行分析,对TCGA等公共数据库的批量RNA测序数据进行计算建模,量化肿瘤组织

中免疫细胞的浸润水平,探究THBS2在COAD中的表达水平和各类免疫细胞浸润的相关性。

1.3 统计学方法

采用Graph Prism 9.0进行统计分析。所有数据均以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,并用Tukey检验进行组间差异比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

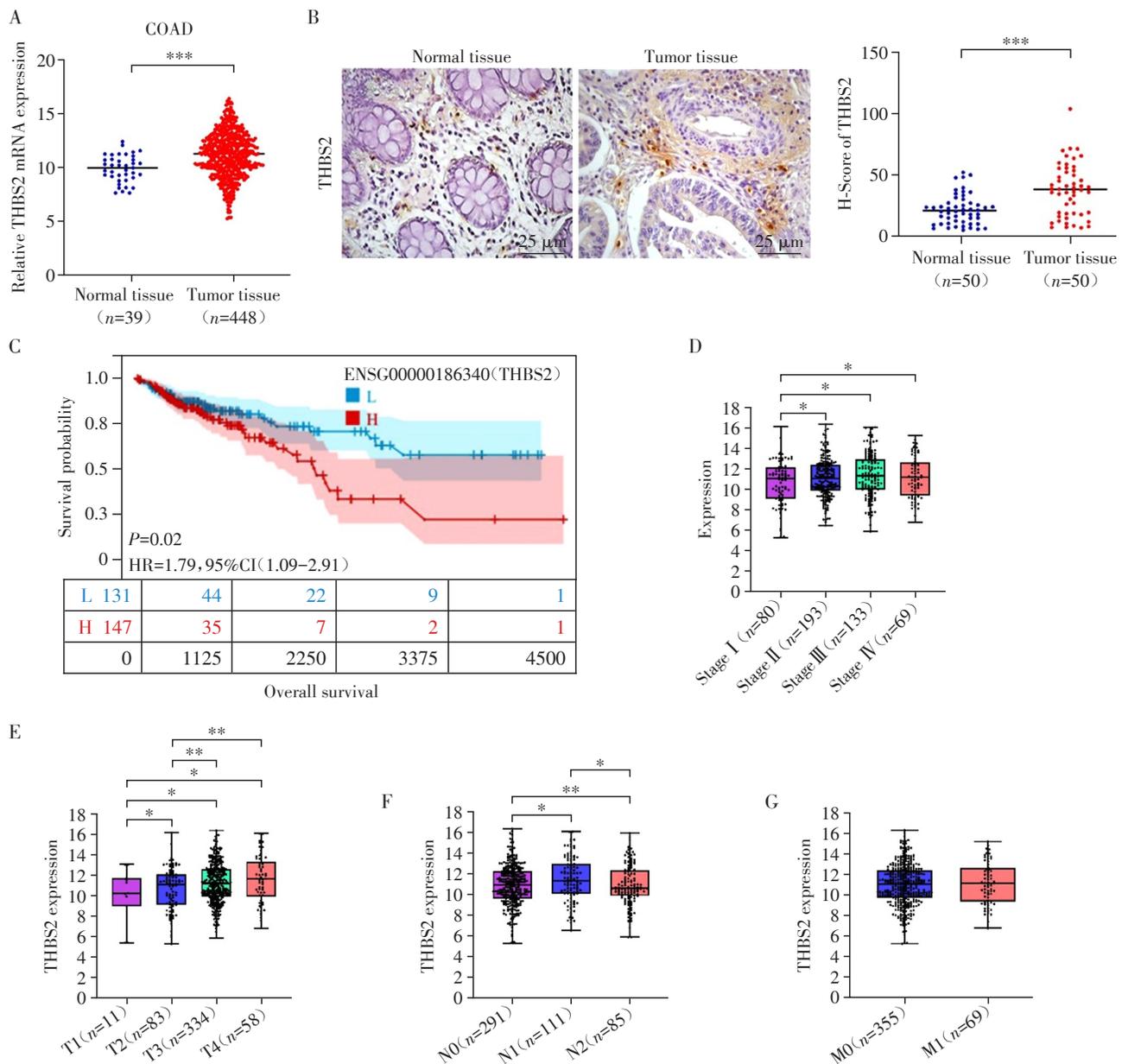
2.1 THBS2表达与CRC进展相关

为系统评估THBS2在CRC中的临床价值,本研究基于TCGA数据库的转录组数据进行生物信息学分析。结果显示,COAD肿瘤组织中THBS2 mRNA表达水平较正常结肠组织显著上调($P < 0.001$,图1A)。对50对配对的临床样本组织进行免疫组织化学检测发现,THBS2在CRC癌组织中的表达强度较癌旁组织增加1.73倍($P < 0.001$,图1B)。TCGA的进一步深度分析发现:THBS2高表达组患者中位OS较对照组缩短43个月($P < 0.001$,图1C);在肿瘤进展分析中,晚期(Ⅲ/Ⅳ期)COAD患者THBS2表达量较早期(Ⅰ/Ⅱ期)升高1.21倍($P < 0.05$,图1D);临床病理参数关联性分析表明,THBS2高表达与更晚期的T分期($P < 0.05$,图1E)、淋巴结转移($P < 0.05$,图1F)及远处转移倾向($P=0.058$,图1G)显著相关。上述证据提示,THBS2在CRC组织中呈现特异性高表达特征,其表达水平与肿瘤恶性进展及不良预后密切相关,可能是评估CRC生物学行为的潜在分子标志物。

2.2 CAF来源的THBS2表达与M2型巨噬细胞浸润密切相关

为明确THBS2的细胞来源,本研究首先整合单细胞转录组分析及实验验证策略。基于TISCH2单细胞数据库对GSE166555数据集的分析显示,THBS2阳性细胞在成纤维细胞亚群中特异性富集($P < 0.05$,图2A)。TIMER2.0数据库的免疫浸润分析进一步发现,THBS2 mRNA表达水平与CAF呈强正相关($r=0.931$, $P < 0.001$,图2B),提示THBS2可能主要来源于CAF。CRC组织多重免疫荧光染色结果证实,THBS2阳性细胞与FAP⁺CAF共定位(图2C),从蛋白水平支持上述结论。

为验证CAF具有分泌THBS2功能,从CRC患者新鲜组织中分离原代CAF及NF。Western blot结果显示,相比NF,CAF中 α -SMA和FAP蛋白表达分别上调



A: Analysis of THBS2 expression in COAD using the TCGA database. B: Immunohistochemical (IHC) detection of THBS2 expression in clinical tissue samples. C: Kaplan-Meier analysis of the correlation between high/low THBS2 expression and overall survival in COAD patients from the TCGA database. D: Analysis of the relationship between THBS2 expression and clinical stage in the TCGA COAD cohort. E-G: Analysis of THBS2 expression in COAD patients stratified by tumor stage(T stage, E), lymph node metastasis(N stage, F), and distant metastasis(M stage, G) using TCGA data. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$.

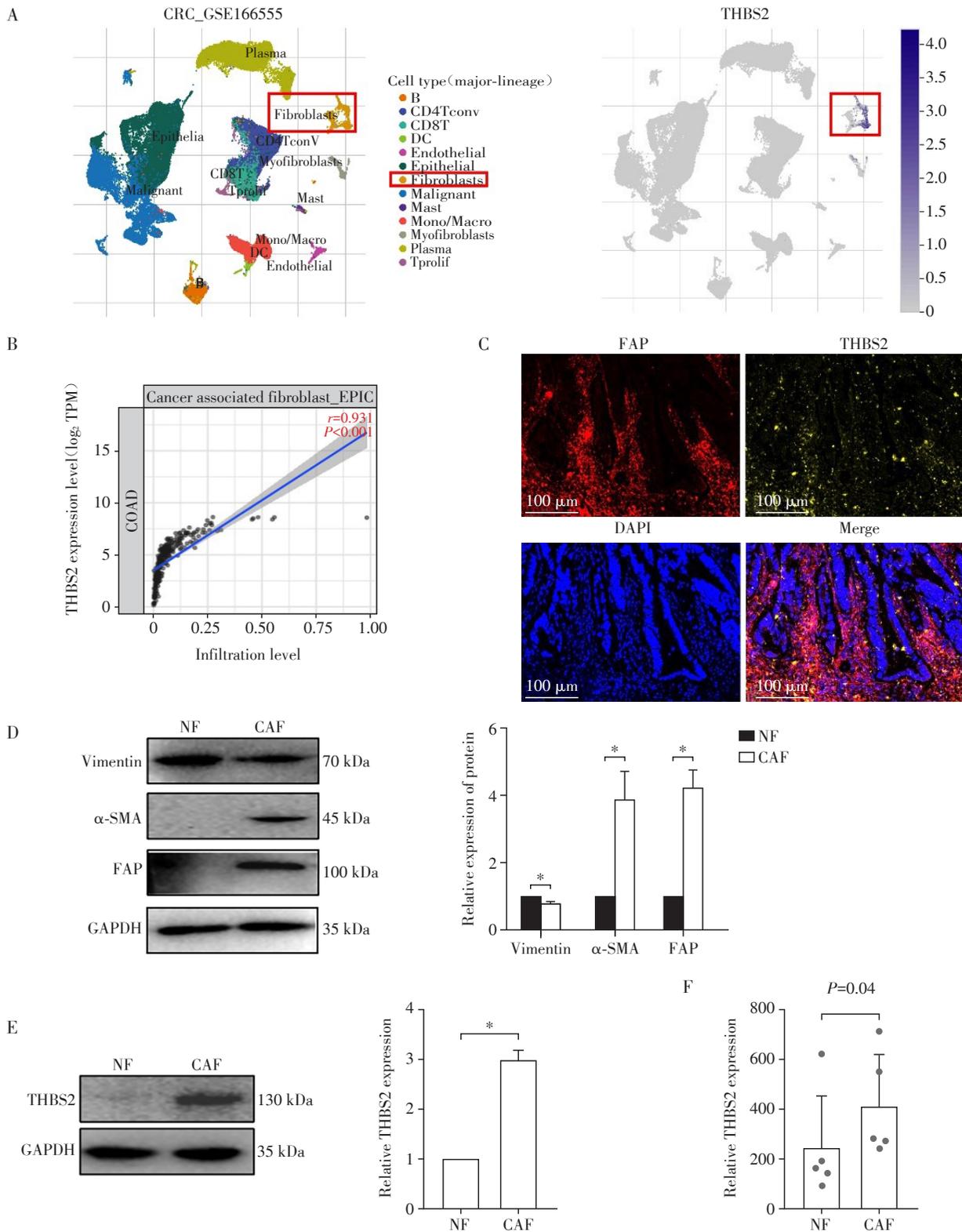
图1 THBS2表达与CRC进展相关

Figure 1 THBS2 expression was associated with CRC progression

3.9倍($P < 0.05$)和4.2倍($P < 0.05$),而Vimentin表达下调20.2%,符合CAF活化表型特征($P < 0.05$,图2D);同时细胞内THBS2蛋白水平增加2.9倍($P < 0.05$,图2E)。ELISA检测证实,CAF培养上清中THBS2分泌量较NF升高1.7倍($P < 0.05$,图2F),这些结果共同证实THBS2主要由CAF分泌产生。

基于CAF重塑TME的理论,进一步解析THBS2

与免疫浸润的关联机制。TIMER2.0数据库分析表明,THBS2高表达与M2型巨噬细胞浸润呈最强正相关(图3A, $r=0.655$, $P < 0.001$),其次为Tregs(图3B, $r=0.306$, $P < 0.001$)、中性粒细胞(图3C, $r=0.295$, $P < 0.001$)、 $CD8^+$ T细胞(图3D, $r=0.229$, $P < 0.001$)、NK细胞(图3E, $r=0.162$, $P < 0.001$)及B细胞(图3F, $r=0.161$, $P < 0.001$)。而THBS2与 $CD4^+$



A: UMAP clustering plot(left) and UMAP clustering plot showing cellular localization of THBS2 expression(right) in single-cell sequencing dataset GSE166555 (n=12). B: Correlation analysis between THBS2 and CAFs in COAD using the TIMER2.0 database (n=458). C: Expression and spatial localization of THBS2 and FAP in clinical CRC tissue samples detected by multiplex immunohistochemistry (n=5). D: Western blot analysis of CAF markers(Vimentin, α-SMA, FAP) in NF and CAF(n=3). E: Western blot analysis of THBS2 expression in NF and CAF(n=3). F: ELISA quantification of THBS2 levels in conditioned medium from NF and CAF(n=5). *P<0.05.

图2 THBS2主要由CAF分泌产生

Figure 2 THBS2 was mainly secreted by CAF

T 细胞(图 3G, $r=-0.077$, $P < 0.05$)及树突状细胞(图 3H, $r=-0.238$, $P < 0.001$)呈负相关(图 3), 提示其可能通过调控特定免疫亚群影响微环境稳态。上述数据表明, CAF 来源的 THBS2 与 M2 型巨噬细胞浸润显著相关, 但其是否通过直接调控巨噬细胞极化或与其他基质因子协同作用, 仍需进一步分析。

2.3 THBS2 促进巨噬细胞极化与迁移

通过功能实验解析 THBS2 对巨噬细胞的作用。首先构建 THP-1 巨噬细胞极化模型, 分别采用 CAF-CM 和 NF-CM 处理 PMA 诱导的 M0 巨噬细胞。qRT-PCR 结果显示, 相比 NF-CM 组, CAF-CM 处理显著抑制 M1 型标志物表达(IL-1 β 下降 71.2%, $P < 0.05$; IL-6 下降 91.1%, $P < 0.01$; TNF- α 下降 68.3%, $P < 0.05$), 同时促进 M2 型标志物表达(IL-10 上调 9.6 倍, $P < 0.01$; CD206 上调 12.5 倍, $P < 0.001$; ARG1 上调 2.7 倍, $P < 0.05$, 图 4A)。Transwell 迁移实验进一步表明, CAF-CM 处理的巨噬细胞迁移能力增强至对照组的 1.3 倍($P < 0.05$, 图 4B), 提示 CAF 分泌物质具有驱动巨噬细胞向 M2 表型极化并增强其迁移活性的功能。

为明确 THBS2 的关键作用, 采用重组人源 THBS2 蛋白直接刺激 M0 巨噬细胞。qRT-PCR 检测显示, THBS2 处理显著抑制 M1 型标志物表达, 与空白对照组相比, IL-1 β 表达下降 40.8% ($P < 0.05$), IL-6 下降 65.5% ($P < 0.05$), TNF- α 下降 53.1% ($P < 0.05$); 同时协同 IL-4 增强 M2 型标志物表达, IL-10 表达上调 2.2 倍 ($P < 0.05$), CD206 上调 1.5 倍 ($P < 0.01$); ARG1 上调 3.2 倍 ($P < 0.01$, 图 3C)。迁移实验证实, THBS2 刺激使巨噬细胞穿膜数增加至对照组的 1.3 倍 ($P < 0.05$, 图 4D), 初步验证 THBS2 促进巨噬细胞 M2 极化和迁移的作用。

通过 siRNA 敲低 CAF 中 THBS2 表达(敲低效率 >58%, $P < 0.05$, 图 5A、B)进行功能拯救实验。结果显示, 与对照 si-nc-CM 相比, THBS2 敲低条件培养基(si-2-CM、si-3-CM)处理的巨噬细胞中, M2 型标志物表达显著下调(si-2-CM 组: IL-10 下降 63.8%, $P < 0.05$; CD206 下降 62.9%, $P < 0.01$; ARG1 下降 26.3%, $P < 0.05$; si-3-CM 组: IL-10 下降 60.2%, $P < 0.05$; CD206 下降 74%, $P < 0.01$; ARG1 下降 9.6%, $P < 0.05$, 图 5C)。迁移实验进一步显示, THBS2 敲低条件培养基抑制了巨噬细胞迁移能力, si-2-CM 组减少 25.8%, si-3-CM 组减少 27.5% ($P < 0.05$, 图 5D), 提示 THBS2 是 CAF 调控巨噬细胞 M2 极化和迁移表

型的重要介质。

综上, CAF 通过分泌 THBS2 发挥双重调控作用, 既可诱导巨噬细胞向 M2 抗炎表型极化, 又能增强其迁移浸润能力。但其具体分子机制还需要实验进一步阐明。

2.4 THBS2 通过激活 PI3K/AKT 通路促进巨噬细胞 M2 极化

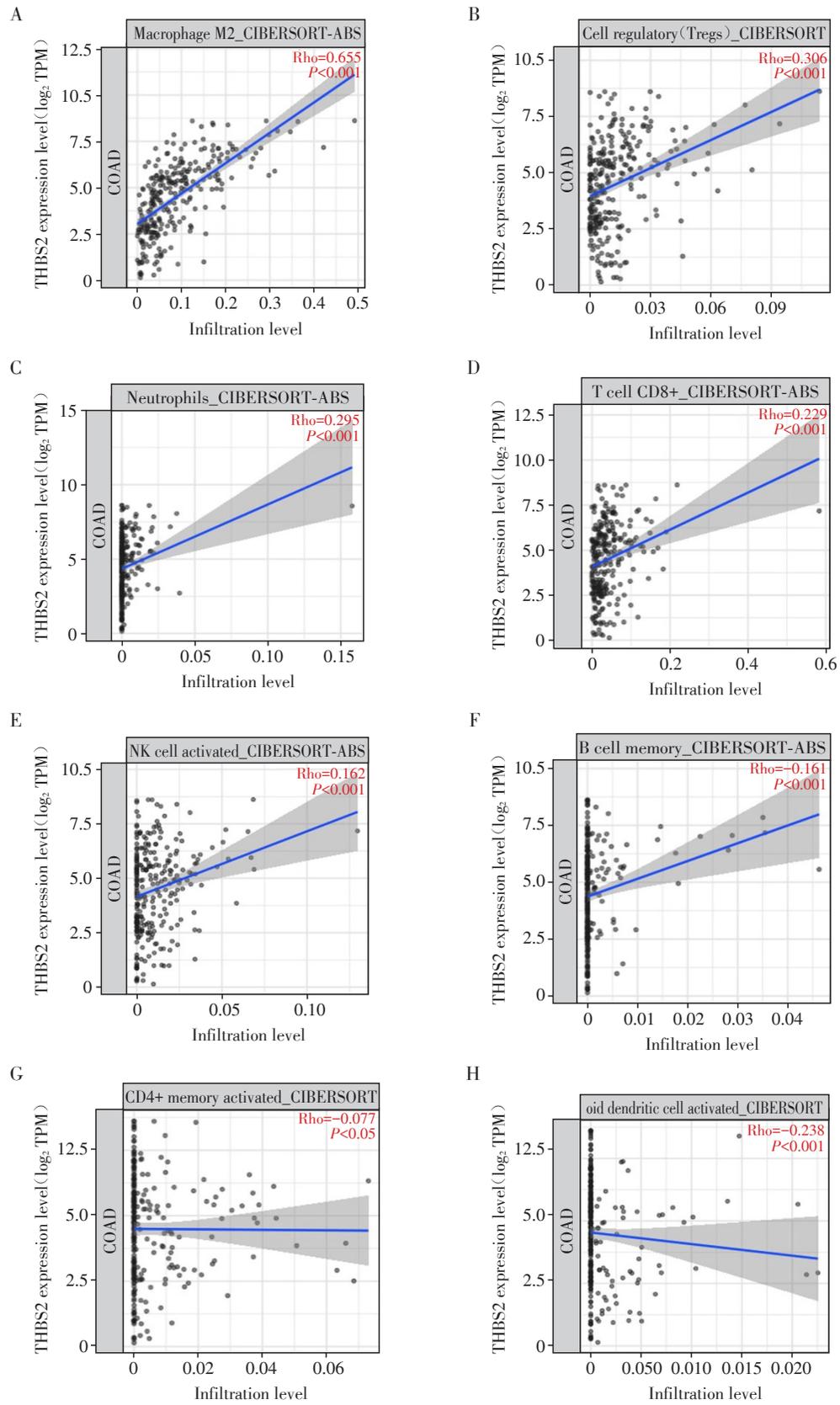
基于文献报道的 PI3K/AKT 信号通路在巨噬细胞极化中的作用^[19], 构建 M2 极化模型进行验证。IL-4 诱导 THP-1 细胞 M2 极化后, Western blot 分析显示, 与未极化(M0)细胞相比, M2 标志物 ARG1 表达上调至 2.1 倍 ($P < 0.05$), 同时 p-PI3K 和 p-AKT 水平分别升高 1.6 倍 ($P < 0.05$) 和 1.8 倍 ($P < 0.05$), 而总 PI3K 以及 AKT 蛋白量无显著变化(图 6A), 提示 PI3K/AKT 信号通路激活是巨噬细胞 M2 极化的重要分子机制。

为进一步阐明 CAF 对 PI3K/AKT 通路的调控作用, 采用 CAF-CM 和 NF-CM 处理 M0 巨噬细胞。结果显示, 相比 NF-CM 组, CAF-CM 处理后 ARG1 表达升高 2.5 倍 ($P < 0.05$), 同时 p-PI3K 和 p-AKT 水平分别增加 1.8 倍和 1.9 倍 ($P < 0.05$, 图 6B)。重组 THBS2 蛋白直接刺激 M0 细胞, 发现其诱导 ARG1 表达是 IL-4 刺激组的 1.5 倍 ($P < 0.05$), 且 p-PI3K 以及 p-AKT 激活水平较 IL-4 组提高 1.2 倍和 1.3 倍 ($P < 0.05$, 图 6C), 提示 THBS2 可能是介导该信号通路激活的关键效应分子之一。

接着通过 THBS2 敲低 CAF 的条件培养基(si-2-CM、si-3-CM)进行拯救实验。结果显示, 与对照 siRNA 组相比, THBS2 敲低组的条件培养基降低巨噬细胞中 ARG1 表达(si-2-CM 下降 59.9%, si-3-CM 下降 20.2%), 以及 p-PI3K (si-2-CM 下降 45.8%, si-3-CM 下降 22.3%) 和 p-AKT (si-2-CM 下降 50.2%, si-3-CM 下降 47%) 水平 ($P < 0.05$, 图 6D), 提示 CAF 通过分泌 THBS2 调控 PI3K/AKT 通路激活。

3 讨论

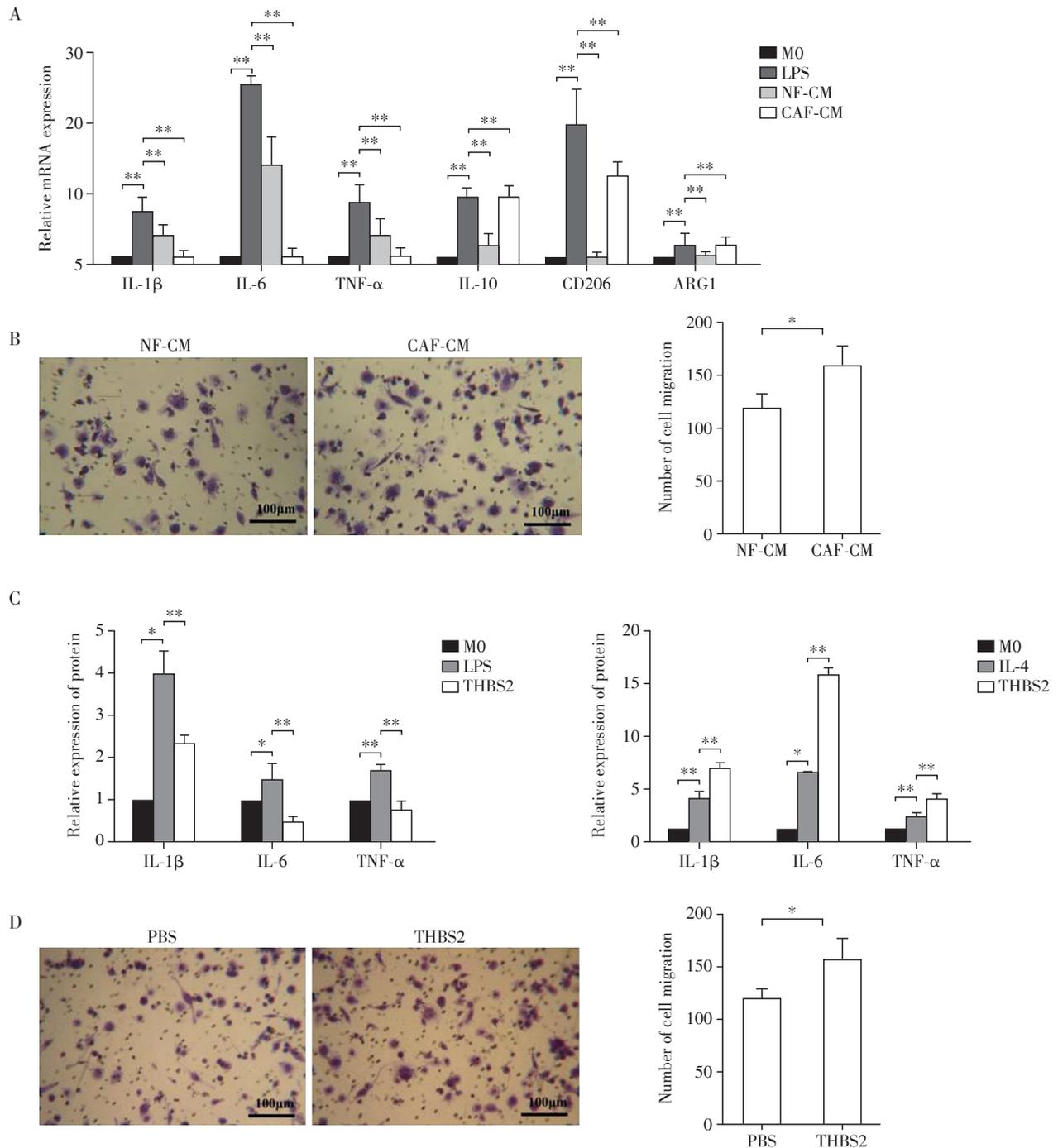
TME 作为调控恶性肿瘤发生发展的关键生态系统, 其动态互作网络在肿瘤免疫逃逸及转移中的生物学机制已成为研究热点。现有研究表明, TME 通过细胞互作(如 Notch-Jagged 信号)或分泌 TGF- β 、IL-6 等可溶性因子, 诱导 CAF、TAM 等基质细胞发生促癌表型转化^[20]。本研究发现 THBS2 作为 CAF 分泌的关键效应分子, 可通过激活 PI3K/AKT 通路在 TME 免疫调控中发挥重要作用。



Correlation analysis between THBS2 expression and infiltration levels of macrophages (A), Tregs (B), neutrophils (C), CD8⁺ T cell (D), NK cells (E), B cells (F), CD4⁺ T cells (G) and dendritic cells (H) in COAD using the TIMER2.0 database ($n=458$).

图3 CAF来源的THBS2表达与M2型巨噬细胞浸润密切相关

Figure 3 THBS2 secreted by CAF was significantly correlated with M2-polarized macrophage infiltration



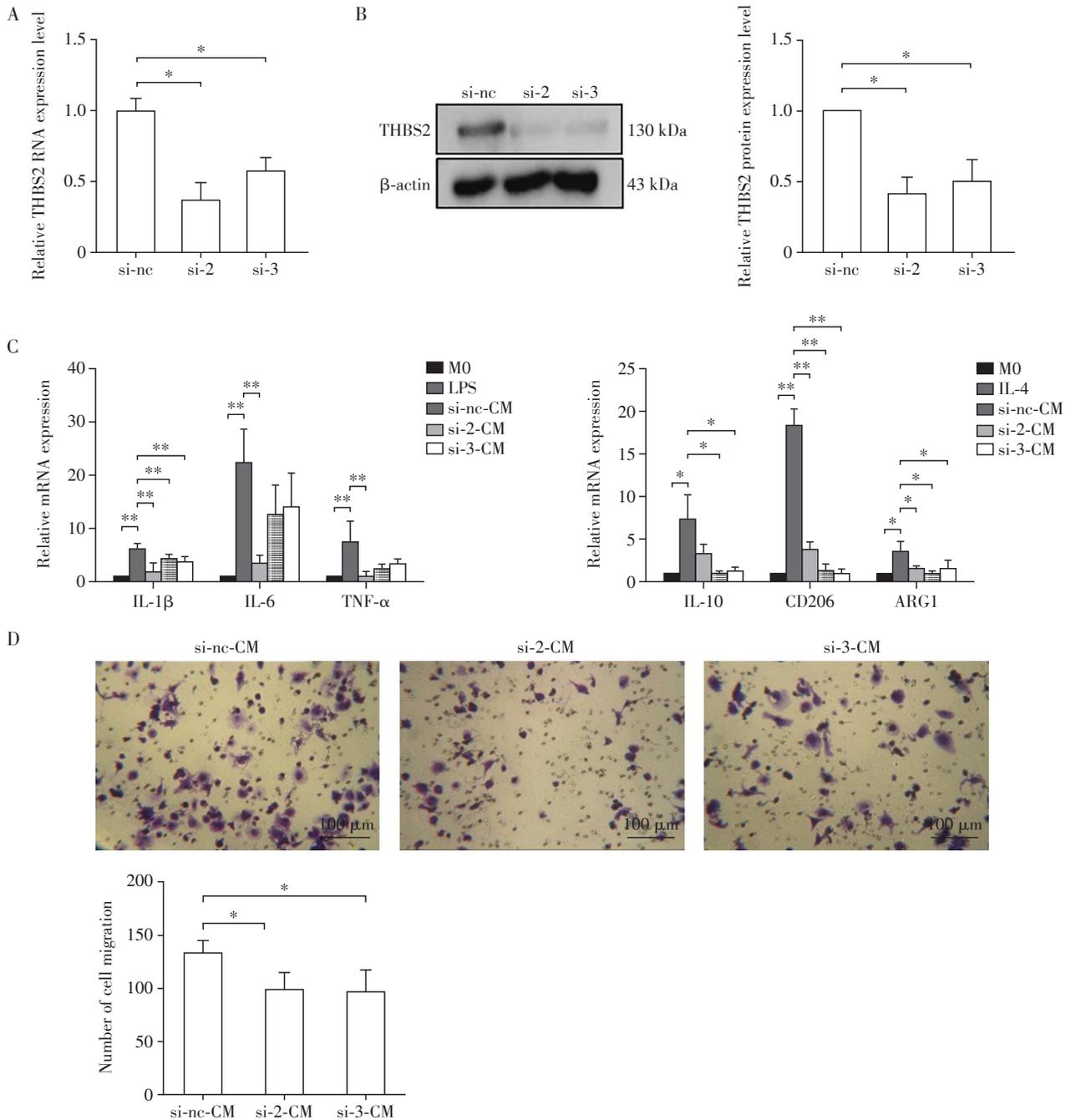
A: qRT-PCR analysis of M1/M2 polarization marker mRNA expression in THP-1 macrophages treated with NF-CM or CAF-CM (n=3). B: Transwell migration assay assessing the migration capacity of THP-1 macrophages treated with NF-CM or CAF-CM (n=3). C: qRT-PCR analysis of M1/M2 polarization marker mRNA expression in THP-1 macrophages stimulated with recombinant THBS2 protein (n=3). D: Transwell migration assay assessing the migration capacity of THP-1 macrophages stimulated with recombinant THBS2 protein (n=3). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

图4 THBS2促进巨噬细胞极化与迁移

Figure4 THBS2 promoted macrophage polarization and migration

巨噬细胞表型极化是CAF介导免疫抑制微环境形成的重要机制。单细胞测序分析发现, CRC组织中THBS2表达水平与M2型TAM浸润呈显著正相关。细胞实验发现, CAF来源的THBS2可特异性上

调M2标志物ARG1、CD206表达, 并抑制M1标志物IL-1 β 、TNF- α 水平, 而THBS2敲低后该效应显著逆转。上述结果提示, 靶向CAF-TAM调控轴可能通过逆转M2极化实现免疫微环境重编程, 其中THBS2



A: qRT-PCR validation of THBS2 mRNA expression knockdown efficiency in CAFs following siRNA transfection (n=3). B: Western blot validation of THBS2 protein expression knockdown efficiency following siRNA transfection in CAFs (n=3). C: qRT-PCR analysis of M1/M2 polarization marker mRNA expression in THP-1 macrophages treated with CM from THBS2-knockdown CAFs (n=3). D: Transwell migration assay assessing the migration capacity of THP-1 macrophages treated with CM from THBS2-knockdown CAFs (n=3). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

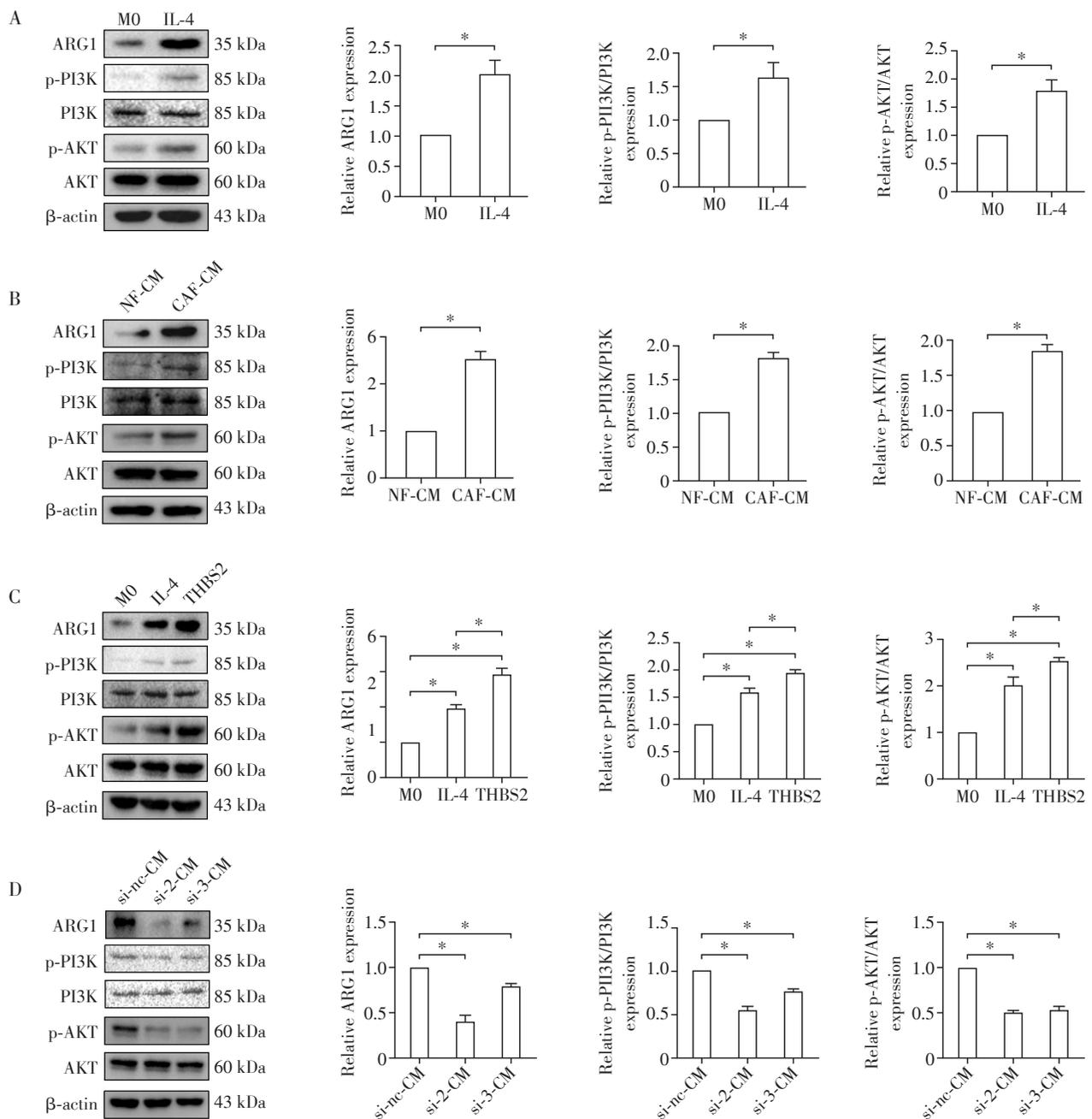
图5 敲低 THBS2 抑制巨噬细胞极化与迁移

Figure 5 Knockdown of THBS2 inhibited macrophage polarization and migration

可作为潜在干预靶点。

CAF作为TME中关键的异质性成分,可通过多种机制驱动肿瘤进展。多项研究发现,CAF通过分泌VEGF、PDGF等促血管生成因子诱导肿瘤血管异常增生,并激活上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal

transition, EMT)信号通路促进转移^[21];同时,CAF上调MMP表达形成ECM屏障,阻碍药物渗透及免疫细胞浸润^[22]。在免疫调控方面,CAF不仅能够招募具有免疫抑制功能的调节性T细胞(CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg),还可通过分泌特定细胞因子诱导巨噬



A: Western blot analysis of ARG1, PI3K, AKT, phosphorylated PI3K (p-PI3K), and phosphorylated AKT (p-AKT) expression in IL-4-stimulated macrophages ($n=3$). B: Western blot analysis of ARG1, PI3K, AKT, p-PI3K, and p-AKT expression in macrophages treated with NF-CM or CAF-CM ($n=3$). C: Western blot analysis of ARG1, PI3K, AKT, p-PI3K, and p-AKT expression in macrophages treated with recombinant THBS2 protein ($n=3$). D: Western blot analysis of ARG1, total PI3K, total AKT, p-PI3K, and p-AKT expression in macrophages treated with CM from CAFs with THBS2 knockdown ($n=3$). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

图6 THBS2通过激活PI3K/AKT通路促进巨噬细胞M2极化

Figure 6 THBS2 promoted macrophage M2 polarization by activating the PI3K/AKT signaling pathway

细胞向M2表型极化,从而建立免疫抑制微环境^[23-24]。本研究通过ELISA检测发现CRC来源的CAF分泌THBS2水平显著高于NF,并通过激活PI3K/AKT信号通路促进巨噬细胞M2极化。这一发现与Hu等^[21]报道的CAF来源MALAT1通过EMT途径促转

移的机制形成功能互补,共同提示CAF可通过分泌不同效应分子协同调控肿瘤进展。

PI3K/AKT信号通路在THBS2介导的生物学效应中发挥核心作用。文献报道THBS2可通过该通路参与肿瘤血管生成^[25]、EMT^[26]及细胞凋亡调控^[27]。

不同于Liu等^[28]发现长链非编码RNA RP11-417E7.1可通过表观遗传调控促进THBS2表达,进而激活Wnt/ β -catenin通路驱动肿瘤进展,本研究发现THBS2通过PI3K/AKT通路直接调控巨噬细胞M2极化,揭示其独立于Wnt通路的新机制。此外,研究显示THBS2可通过上调COL8A1激活整合素受体-PI3K/AKT磷酸化级联反应,导致CRC化疗耐药^[26]。在肾细胞癌中,THBS2亦通过PI3K/AKT通路介导M2极化促进免疫逃逸^[29]。上述证据共同提示THBS2可能作为连接CAF基质重塑与免疫调控功能的关键分子节点,但其在CRC中是否通过抑制M1极化间接增强促瘤效应仍需深入研究。

本研究系统阐明了CAF-THBS2轴通过PI3K/AKT通路调控巨噬细胞极化的分子机制,为CRC精准治疗提供了新思路。基于上述发现,开发THBS2中和抗体与PD-1抑制剂的联合治疗方案,可能通过协同作用逆转免疫抑制微环境,为CRC的免疫治疗策略提供新思路。

利益冲突声明:

所有作者声明无利益冲突。

Conflict of Interests:

All authors declare no conflict of interests.

作者贡献声明:

徐甲负责研究构思、实验方法设计、实验操作、实验数据收集与分析、论文初稿撰写及修订;厉梦琪负责实验方法设计、实验操作、协助数据分析;袁小琴负责研究构思、研究课题监管与指导、提供研究资金支持、论文审阅与修订。

Author's Contributions:

XU Jia was responsible for conceptualization, methodology, investigation, data curation, analysis, writing and revising original draft. LI Mengqi was responsible for methodology, investigation and analysis. YUAN Xiaoqin was responsible for conceptualization, supervision, funding acquisition, writing, reviewing and revising the manuscript.

[参考文献]

- [1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263
- [2] XIA C, DONG X, LI H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2022, 135(5): 584-590
- [3] SINGH M, MORRIS V K, BANDEY I N, et al. Advancements in combining targeted therapy and immunotherapy for colorectal cancer [J]. *Trends Cancer*, 2024, 10(7): 598-609
- [4] DEKKER E, TANIS P J, VLEUGELS J L A, et al. Colorectal cancer [J]. *Lancet*, 2019, 394(10207): 1467-1480
- [5] CASSIM S, POUYSSEGUR J. Tumor microenvironment: a metabolic player that shapes the immune response [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 21(1): 157
- [6] VALKENBURG K C, DE GROOT A E, PIENTA K J. Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(6): 366-381
- [7] MYERS K V, AMEND S R, PIENTA K J. Targeting Tyro3, Axl and MerTK (TAM receptors): implications for macrophages in the tumor microenvironment [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 94
- [8] TKACH M, THÉRY C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go [J]. *Cell*, 2016, 164(6): 1226-1232
- [9] KALLURI R. The biology and function of fibroblasts in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(9): 582-598
- [10] CHEN X, SONG E. Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(2): 99-115
- [11] CASSETTA L, POLLARD J W. Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(12): 887-904
- [12] HONG S M, LEE A Y, KIM B J, et al. NAMPT-driven M2 polarization of tumor-associated macrophages leads to an immunosuppressive microenvironment in colorectal cancer [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(14): e2303177
- [13] WANG H, TIAN T, ZHANG J. Tumor-associated macrophages (TAMs) in colorectal cancer (CRC): from mechanism to therapy and prognosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8470
- [14] WEI C, YANG C, WANG S, et al. Crosstalk between cancer cells and tumor associated macrophages is required for mesenchymal circulating tumor cell-mediated colorectal cancer metastasis [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 64
- [15] TAN J, FAN W, LIU T, et al. TREM2 (+) macrophages suppress CD8 (+) T-cell infiltration after transarterial chemoembolisation in hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2023, 79(1): 126-140
- [16] ZHANG K, LI M, YIN L, et al. Role of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 in cardiovascular diseases (review) [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 45(5): 1275-1293
- [17] HISCOTT P, PARAOAN L, CHOUDHARY A, et al. Thrombospondin 1, thrombospondin 2 and the eye [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2006, 25(1): 1-18
- [18] JIANG M, LI X, ZHANG J, et al. Dual inhibition of endoplasmic reticulum stress and oxidation stress manipulates the polarization of macrophages under hypoxia to sensi-

- tize immunotherapy[J]. ACS Nano, 2021, 15(9): 14522-14534
- [19] HOFMANN B T, JÜCKER M. Activation of PI3K/Akt signaling by N-terminal SH2 domain mutants of the p85 α regulatory subunit of PI3K is enhanced by deletion of its c-terminal SH2 domain[J]. Cell Signal, 2012, 24(10): 1950-1954
- [20] DE VISSER K E, JOYCE J A. The evolving tumor microenvironment: from cancer initiation to metastatic outgrowth[J]. Cancer Cell, 2023, 41(3): 374-403
- [21] HU J H, TANG H N, WANG Y H. Cancer-associated fibroblast exosome LINC00355 promotes epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in colorectal cancer through the miR-34b-5p/CRKL axis[J]. Cancer Gene Ther, 2024, 31(2): 259-272
- [22] BERTERO T, OLDHAM W M, GRASSET E M, et al. Tumor-stroma mechanics coordinate amino acid availability to sustain tumor growth and malignancy [J]. Cell Metab, 2019, 29(1): 124-140
- [23] ZHANG X, SUN X, GUO C, et al. Cancer-associated fibroblast - associated gene IGFBP2 promotes glioma progression through induction of M2 macrophage polarization[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2024, 326(1): C252-C268
- [24] FORD K, HANLEY C J, MELLONE M, et al. NOX4 inhibition potentiates immunotherapy by overcoming cancer-associated fibroblast-mediated CD8 T-cell exclusion from tumors[J]. Cancer Res, 2020, 80(9): 1846-1860
- [25] HUANG J, WANG C, HOU Y, et al. Molecular mechanisms of thrombospondin-2 modulates tumor vasculogenic mimicry by PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 167: 115455
- [26] ZHOU X, HAN J, ZUO A, et al. THBS2⁺ cancer-associated fibroblasts promote EMT leading to oxaliplatin resistance *via* COL8A1 - mediated PI3K/AKT activation in colorectal cancer[J]. Mol Cancer, 2024, 23(1): 282
- [27] AO R, GUAN L, WANG Y, et al. Silencing of COL1A2, COL6A3, and THBS2 inhibits gastric cancer cell proliferation, migration, and invasion while promoting apoptosis through the PI3K-Akt signaling pathway[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(6): 4420-4434
- [28] LIU Y, LV H, LIU X, et al. The RP11-417E7.1/THBS2 signaling pathway promotes colorectal cancer metastasis by activating the Wnt/ β -catenin pathway and facilitating exosome - mediated M2 macrophage polarization [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2024, 43(1): 195
- [29] XU P, FENG D X, WANG J, et al. LncRNA AGAP2 antisense RNA 1 stabilized by insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3 promotes macrophage M2 polarization in clear cell renal cell carcinoma through regulation of the microRNA-9-5p/THBS2/PI3K-Akt pathway[J]. Cancer Cell Int, 2023, 23(1): 330
- (收稿: 2025-04-06; 修回: 2025-08-19; 录用: 2025-09-19)
(本文编辑: 戴玉娟)

本刊现已启用网上稿件管理系统, 作者登陆
<http://jnmn.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询
稿件审理情况。