

烟草诱导的M2型巨噬细胞对肺癌细胞侵袭转移的影响

师萌 王晓慧 邓亚菲 周晓翠 陈虹*

(重庆医科大学附属第一医院呼吸与危重症医学科, 重庆 400016)

摘要 为探究烟草提取物(cigarette smoke extract, CSE)对单核细胞THP-1的趋化作用及CSE活化后的肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)对非小细胞肺癌(non-small-cell lung cancer, NSCLC) A549和PC-9细胞侵袭迁移的影响。CSE处理THP-1细胞96 h后, ELISA检测TGF- β 、TNF- α 、IL-10、IL-12的蛋白表达水平, qRT-PCR检测TGF- β 、TNF- α 、IL-10、IL-12的mRNA表达水平, 流式细胞术检测CD163⁺的表达水平, Western blot检测p-STAT6/STAT6的蛋白表达水平。CSE活化的TAMs与NSCLC细胞共培养, Western blot检测TAMs对NSCLC细胞EMT(E-cadherin和Vimentin)的影响; Transwell检测TAMs对NSCLC细胞侵袭迁移的影响。结果显示, CSE诱导THP-1细胞的表型向M2型TAMs方向分化(TGF- β 、CD163⁺上升, TNF- α 、IL-12下降, $P < 0.05$)。p-STAT6/STAT6通路参与CSE诱导THP-1细胞的M2型转化。CSE诱导的TAMs促进NSCLC细胞发生EMT(E-cadherin下降和Vimentin上升), 进而促进其侵袭迁移($P < 0.05$)。以上结果表明, CSE通过p-STAT6/STAT6诱导THP-1发生M2型TAMs的活化, 活化后的TAMs促进NSCLC细胞发生EMT和侵袭迁移。

关键词 非小细胞肺癌; 肿瘤相关巨噬细胞; 香烟提取物; 上皮间质转化; 侵袭迁移

The Effects of CSE-Induced M2 Polarized Macrophages on Lung Carcinoma Invasion and Migration

Shi Meng, Wang Xiaohui, Deng Yafei, Zhou Xiaocui, Chen Hong*

(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The aim of the study is to investigate the effects of cigarette smoke extract (CSE) on the polarization of monocytes THP-1 cells and the effects of CSE-induced tumor-associated macrophages (TAMs) on the invasion and metastasis of non-small-cell lung cancer (NSCLC) A549 and PC-9 cells. After THP-1 cells were stimulated by CSE for 96 h, TGF- β , TNF- α , IL-10 and IL-12 were examined by ELISA and qRT-PCR and the expression of CD163 was detected by flow cytometry. p-STAT6/STAT6 was significantly activated in THP-1 cells, as determined by Western blot analysis. It was used to detect the protein expression (E-cadherin and Vimentin) of EMT in NSCLC cells by Western blot and the invasion and migration ability of NSCLC cells by Transwell assay after co-culturing with TAMs. The results showed that CSE induced M2 polarization in THP-1 cells (the upregulation of TGF- β , CD163⁺, the downregulation of TNF- α , IL-12, $P < 0.05$). CSE induced M2 polarization in THP-1 cells

收稿日期: 2018-12-24 接受日期: 2019-03-18

重庆自然科学基金(批准号: cstc2011jjA10052)资助的课题

*通讯作者. Tel: 023-89012688, E-mail: hopehong2019@126.com

Received: December 24, 2018 Accepted: March 18, 2019

This study was supported by the Chongqing Nature Science Foundation (Grant No. cstc2011jjA10052)

*Corresponding author. Tel: +86-23-89012688, E-mail: hopehong2019@126.com

网络出版时间: 2019-07-16 16:20:05

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190716.1618.018.html>

through p-STAT6/STAT6 pathway. TAMs promoted EMT (the downregulation of E-cadherin, the upregulation of Vimentin) in NSCLC cells and further enhanced the invasion and migration ability of NSCLC cells ($P < 0.05$). CSE induces the activation of M2-polarized TAMs in THP-1 cells through p-STAT6/STAT6, and TAMs promote EMT, invasion and migration in NSCLC cells.

Keywords non-small-cell lung cancer; tumor-associated macrophages; CSE; EMT; invasion and migration

非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)是造成全球癌症相关死亡的主要原因之一,占肺癌的85%^[1]。随着多种治疗方案的提出,如手术、化疗、靶向治疗等,肺癌患者已获得较高的5年生存率,但是恶性转移及复发仍是其改善治疗效果所面临的主要难题。

肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)对肿瘤的发生、发展和转移有着至关重要的影响。浸润于肿瘤间质中的巨噬细胞被定义为肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs),它是TME中含量最丰富的炎性细胞,在肿瘤的发生发展中发挥重要作用^[2]。烟草已被证明是造成肺癌发生的最大危险因素之一^[3-4]。来自呼吸系统疾病患者和一些健康吸烟者的巨噬细胞具有M2型巨噬细胞的表型^[5];已有报道表明,烟草提取物可以诱导巨噬细胞发生M2型的转变^[6]。而当TAMs呈现M2极化表型时,可以增强肿瘤血管生成、生长、侵袭转移和免疫抑制。

上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是指上皮细胞通过特定程序转化为间质细胞的过程。在此过程中,上皮细胞失去上皮表型特征,下调上皮型钙黏蛋白(E-cadherin),获得间充质细胞表型特征,上调波形蛋白(vimentin)。因此,细胞失去上皮极性,获得成纤维细胞特性,具有高度侵袭性的表型。EMT被认为是增强癌细胞侵袭转移能力的重要步骤。既往研究表明,EMT与非小细胞肺癌患者的不良预后相关^[7-8]。因此本研究着重探讨烟草提取物对TAMs的活化和p-STAT6/STAT6通路的激活及活化后TAMs对肺癌细胞EMT和侵袭转移的影响,以期对NSCLC的治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

烟草提取物是根据Wirtz和Schmidt的方法制备的^[9]。每支烟草成分为:焦油11 mg、一氧化碳17 mg和尼古丁1.1 mg。抽油机上安装一根已拆去过滤嘴的香烟,5 min内燃烧完毕,10支香烟的主流烟雾溶于100 mL无血清RPMI 1640培养基中。由此产生的

液体混合物调整pH值为7.4并用0.22 μm 过滤器过滤大颗粒和细菌,将此浓度设为100%浓度CSE。根据实验稀释到不同浓度,并储存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。PC-9细胞株获赠于第四军医大学附属西京医院张根教授,A549和THP-1细胞获赠于重庆医科大学分子医学与肿瘤实验平台。

1.2 试剂与仪器

细胞培养液RPMI 1640及胎牛血清来自德国PAN公司。鼠抗人CD163单克隆抗体来自德国美天旎生物技术有限公司。逆转录试剂盒、SYBR来自TaKaRa公司。ELISA试剂盒来自江苏酶标生物科技有限公司。兔抗人上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(vimentin)、STAT6、p-STAT6单克隆抗体来自CST公司。GAPDH、羊抗兔二抗来自Proteintech公司。Matrigel基质胶、Transwell小室来自美国Corning公司。研究卷烟(中国红参)购自重庆烟草工业股份有限公司。

1.3 细胞培养

A549、PC-9和THP-1细胞均培养于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中,用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液进行培养,隔天换培养液,取处于对数期的细胞用于后期实验。烟草提取物处理后的THP-1分别与A549和PC-9共培养。共培养实验:将对数期的 3×10^5 个A549/PC-9细胞接种于6孔板中,分为实验组和对照组。待细胞贴壁后,实验组使用0.4 μm 的Transwell小室,小室上室加入经4% CSE处理后的THP-1细胞(3×10^5 个),共培养72 h,对照组单独培养72 h。

1.4 qRT-PCR检测M1/M2型相关细胞因子mRNA

取处于对数生长期的THP-1细胞以 1×10^5 个/孔接种于6孔板中,分为3组(0% CSE组、2% CSE组和4% CSE组),用不同浓度的CSE分别刺激THP-1细胞96 h。离心收集细胞,将上述不同烟草浓度处理的THP-1细胞,采用Trizol法提取总RNA,按PrimeScript^{RT} reagent Kit说明书进行逆转录。获取cDNA后按SYBR Premix Ex Taq、上下游引物、cDNA、蒸馏水分别为5 μL 、1 μL 、2 μL 和2 μL 配成10 μL 的反应体系。在荧光定量

表1 引物序列
Table 1 Prime sequence

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>TNF-α</i>	CGT GGA GCT GGC CGA GGA G	AGG AAG GAG AAG AGG CTG AGG AAC
<i>IL-12</i>	ACC AGA GCA GTG AGG TCT TAG GC	TGT GAA GCA GCA GGA GCG AAT G
<i>TGF-β</i>	AGC AAC AAT TCC TGG CGA TAC CTC	TCA ACC ACT GCC GCA CAA CTC
<i>IL-10</i>	GAC TTT AAG GGT TAC CTG GGT TG	TCA CAT GCG CCT TGA TGT CTG
<i>GAPDH</i>	ACC TGA CCT GCC GTC TAG AA	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA

仪上扩增, 按95 °C 30 s预变性; 再按95 °C 5 s, 58 °C 40 s扩增39个循环。统计数据, 根据 ΔC_t 值($C_{q\text{目地}}-C_{q\text{内参}}$)统计出的 $2^{-\Delta C_t}$ 值为该基因的相对表达水平。引物序列见表1。

1.5 ELISA检测上清液中M1/M2型相关细胞因子的含量

收集经0% CSE、2% CSE、4% CSE处理后的THP-1培养液上清。将试剂和细胞培养液上清置于室温下平衡30 min, 按照说明书稀释标准品; 标准孔、待测样品孔分别加入标准品或样品50 μL, 37 °C温育30 min; 弃去液体, 每孔加满洗涤液, 洗涤5次, 弃掉液体并拍干; 每孔加入酶标试剂50 μL(空白孔除外), 37 °C温育30 min; 重复以上洗涤过程, 每孔加入显色剂100 μL, 37 °C避光10 min, 终止反应; 在450 nm波长依序测量各孔的吸光度(*D*)值。根据*D*值绘制标准曲线, 计算样品浓度。

1.6 流式细胞术检测CD163的表达水平

每孔(6孔板)加入 1×10^5 个处于对数生长期的THP-1细胞, 分为0% CSE、2% CSE、4% CSE组, 培养96 h; 用PBS洗涤2次, 每次离心5 min, 1 500 r/min, 弃掉上清; 实验组加入98 μL PBS制成的细胞悬液和2 μL鼠抗人FITC-CD163抗体, 阴性对照组加入100 μL PBS细胞悬液。轻轻混匀, 4 °C避光处孵育30 min; PBS洗涤2次, 每次离心5 min, 1 500 r/min; 使用流式细胞仪检测表面标记物CD163⁺的表达情况。实验重复3次, 采用CytExpert 2.0软件进行数据分析各组细胞中CD163⁺细胞所占百分比。

1.7 Transwell实验检测NSCLC细胞的侵袭迁移能力

侵袭实验: 在8 μm Transwell小室中加入60 μL 1:8稀释的Matrigel, 凝胶5 h后在Transwell小室上室中分别加入 2×10^4 个未经处理或共培养处理的A549和PC-9细胞, 无血清培养基培养, 100 μL/孔, 下室加入500 μL含10%血清的培养基培养24 h。迁移实验: 取8 μm Transwell小室, 不加Matrigel, 上室中分别加

入 1×10^4 个未经处理或共培养处理的A549和PC-9细胞, 无血清培养基培养, 100 μL/孔, 下室中加入500 μL含10%血清的培养基培养24 h。取出小室并弃去上室液体, 用棉签擦去膜上层细胞, 4%多聚甲醛固定30 min, 结晶紫染色20 min, 于倒置显微镜下计穿膜细胞数。

1.8 Western blot检测各组细胞目的蛋白的水平

将THP-1细胞接种于培养瓶中, 分3组: 0% CSE、2% CSE组与4% CSE组, 置于37 °C、5% CO₂的培养箱中孵育96 h。离心弃去废液, 收集细胞。将A549和PC-9接种于6孔板中, 共分为2个组: 对照组和共培养组, 置于37 °C、5% CO₂的培养箱中孵育72 h。弃去废液及上室中的THP-1细胞, 收集A549和PC-9细胞。RIPA蛋白裂解液裂解细胞, 提取蛋白。BCA法测定蛋白浓度。进行电泳, 电转至PVDF膜上, 5% BSA室温封闭2 h。STAT6、P-STAT6、E-cadherin、Vimentin及内参GAPDH抗体4 °C孵育过夜。TBST漂洗3次, 10 min/次, 室温孵育带HRP标记的二抗1.5 h, TBST漂洗3次, ECL试剂盒检测目的蛋白的表达情况。

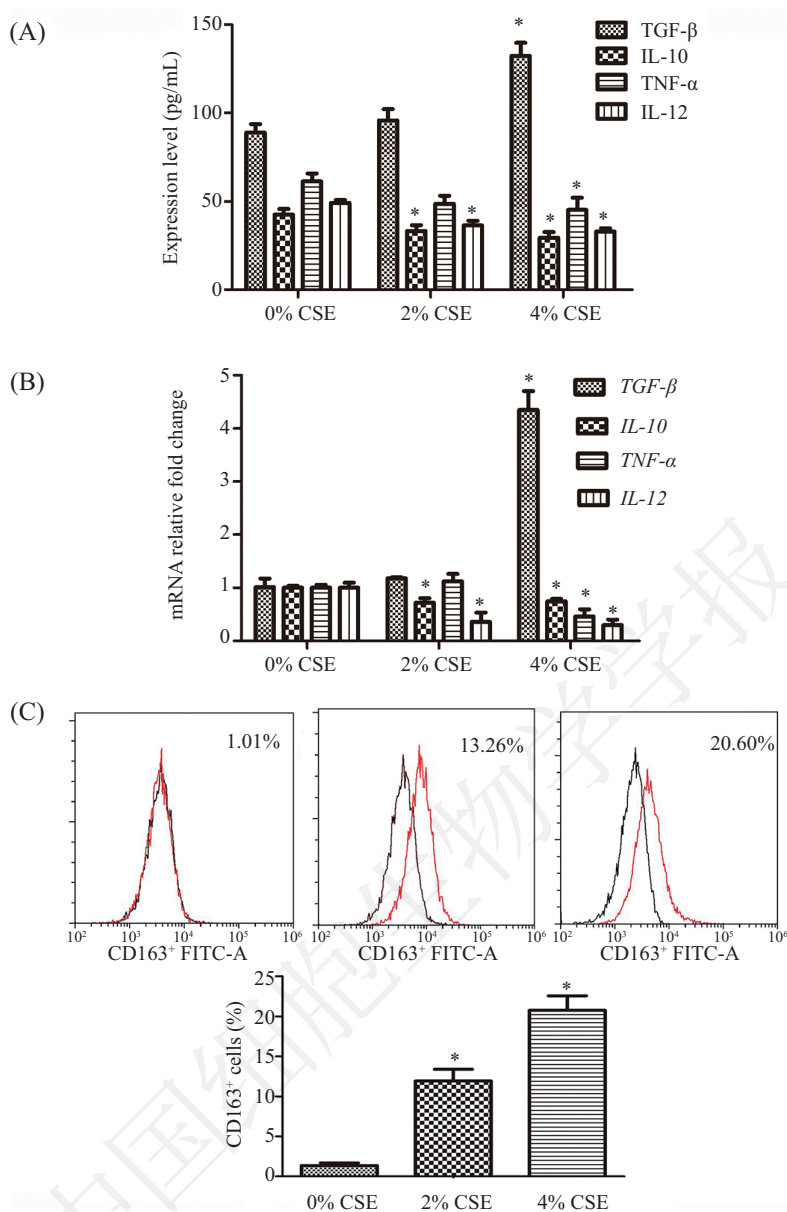
1.9 统计学分析

实验数据以均数±标准差表示, 采用Graph Pad Prism 6.0软件对数据进行统计学分析。多组均数进行One-Way ANOVA检验和两组均数进行Student's *t* 检验。*P*<0.05代表差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CSE可诱导THP-1细胞向M2型TAMs转化

M1巨噬细胞分泌大量的促炎细胞因子, 如TNF-α、IL-12。而M2巨噬细胞表达高水平的TGF-β和IL-10^[10]。CSE刺激THP-1细胞96 h后, ELISA和qRT-PCR检测结果均显示, TNF-α和IL-12的表达水平下降, TGF-β的表达水平增加(*P*<0.05), 但IL-10并没有增加(图1A和图1B), 流式细胞术检测结果显示, CD163⁺的表达量明显升高



A: ELISA检测CSE处理后THP-1细胞96 h后, IL-10、IL-12、TNF-α、TGF-β的表达情况; B: qRT-PCR检测CSE处理THP-1细胞96 h后, IL-10、IL-12、TNF-α、TGF-β的表达情况; C: 流式细胞术检测CSE处理THP-1细胞96 h后, CD163⁺的细胞表达。One-Way ANOVA, * $P < 0.05$, 与0% CSE组相比。A. expression levels of IL-10, IL-12, TNF-α, TGF-β were determined by ELISA after CSE stimulation for 96 h; B: mRNA levels of IL-10, IL-12, TNF-α, TGF-β were determined by qRT-PCR after CSE stimulation for 96 h. C: surface antigen expression of CD163⁺ after treatment with CSE for 96 h was detected by flow cytometry. One-Way ANOVA, * $P < 0.05$ vs 0% CSE group.

图1 CSE促进THP-1细胞向M2型TAMs转化

Fig.1 Effects of CSE on M2 polarization of THP-1 cells

($P < 0.05$, 图1C)。这表明, 细胞因子蛋白和mRNA表达水平及细胞表型实验结果均证明CSE可诱导THP-1细胞向M2型TAMs方向转化。

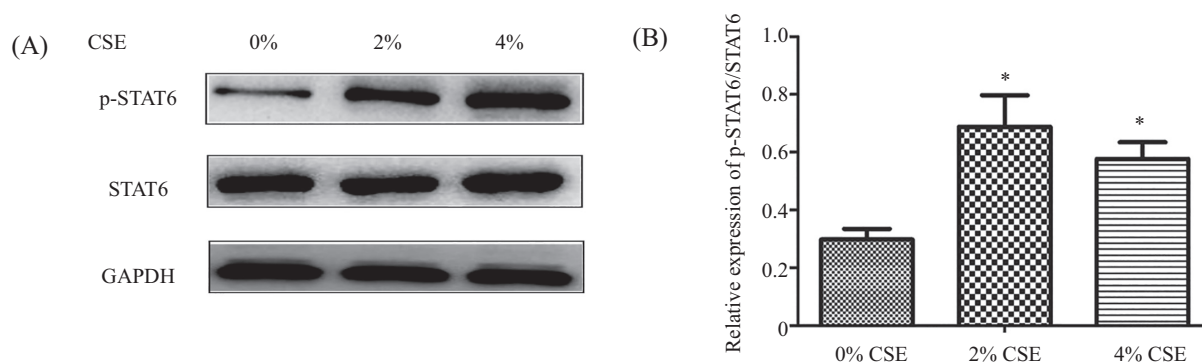
2.2 CSE通过激活p-STAT6/STAT6信号通路促进M2巨噬细胞极化

Western blot检测THP-1细胞经CSE处理后, STAT6通路相关蛋白表达的差异情况。经CSE处理96 h后, THP-1细胞中p-STAT6蛋白表达水平较0% CSE明显

升高($P < 0.05$, 图2)。结果表明, STAT6通路可能参与CSE诱导THP-1细胞极化的生物学表型调控过程。

2.3 CSE诱导的M2型巨噬细胞促进A549和PC-9细胞发生侵袭迁移。

将经CSE处理96 h后的THP-1细胞分别与A549或PC-9细胞共培养24 h, Transwell检测研究TAMs对A549和PC-9细胞侵袭和迁移的影响。A549+TAMs组、PC-9+TAMs组细胞的侵袭(图3A)、迁移(图3B)

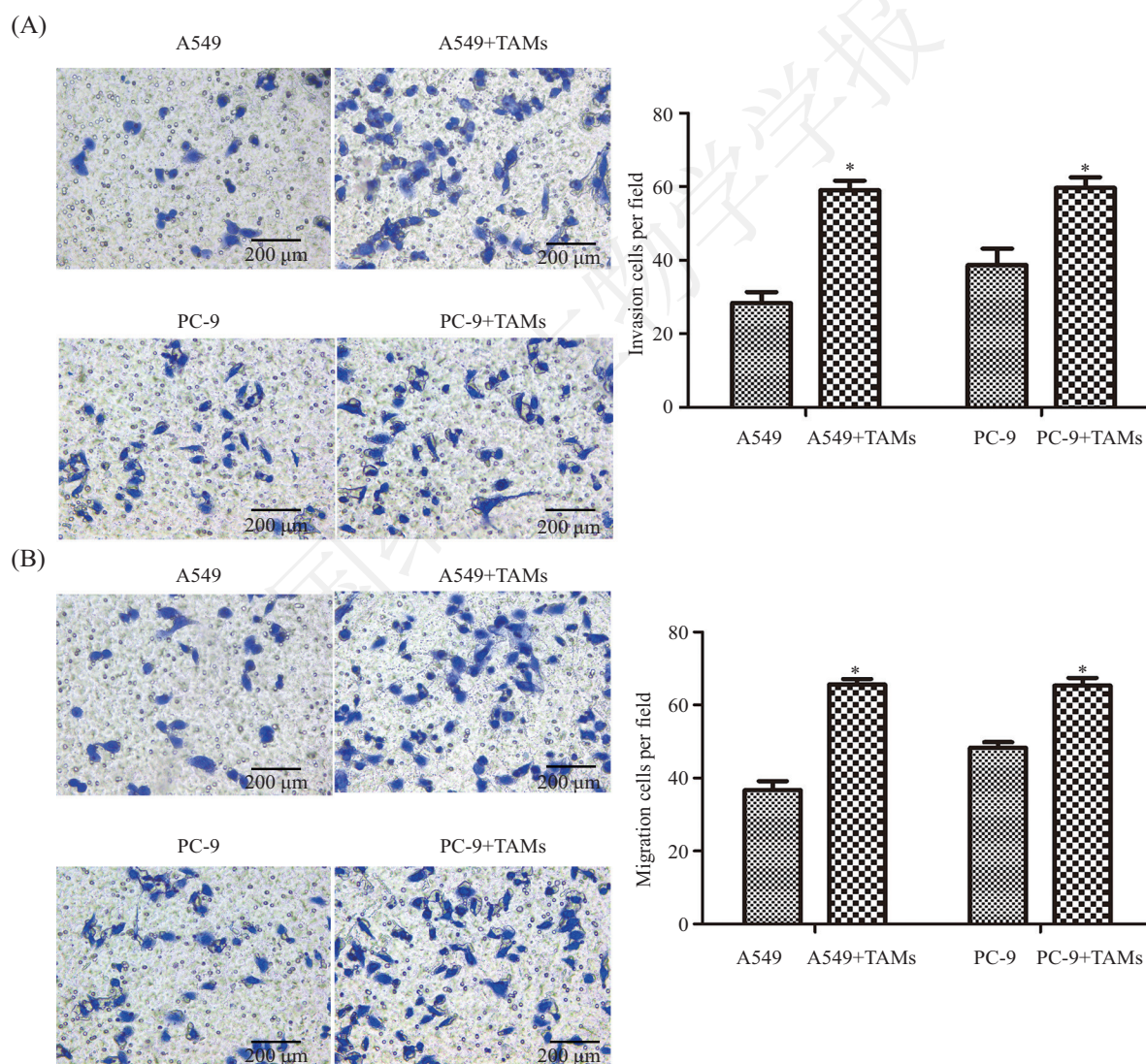


A、B: Western blot检测THP-1细胞经CSE处理96 h后, p-STAT6、STAT6的表达情况。One-Way ANOVA, $*P<0.05$, 与0% CSE组相比。

A,B: expression levels of p-STAT6 and STAT6 were determined by Western blot after CSE stimulation for 96 h. One-Way ANOVA, $*P<0.05$ vs 0% CSE group.

图2 CSE促进THP-1细胞内p-STAT6/STAT6的表达情况

Fig.2 Effect of CSE on the expression of p-STAT6/STAT6 in THP-1 cells

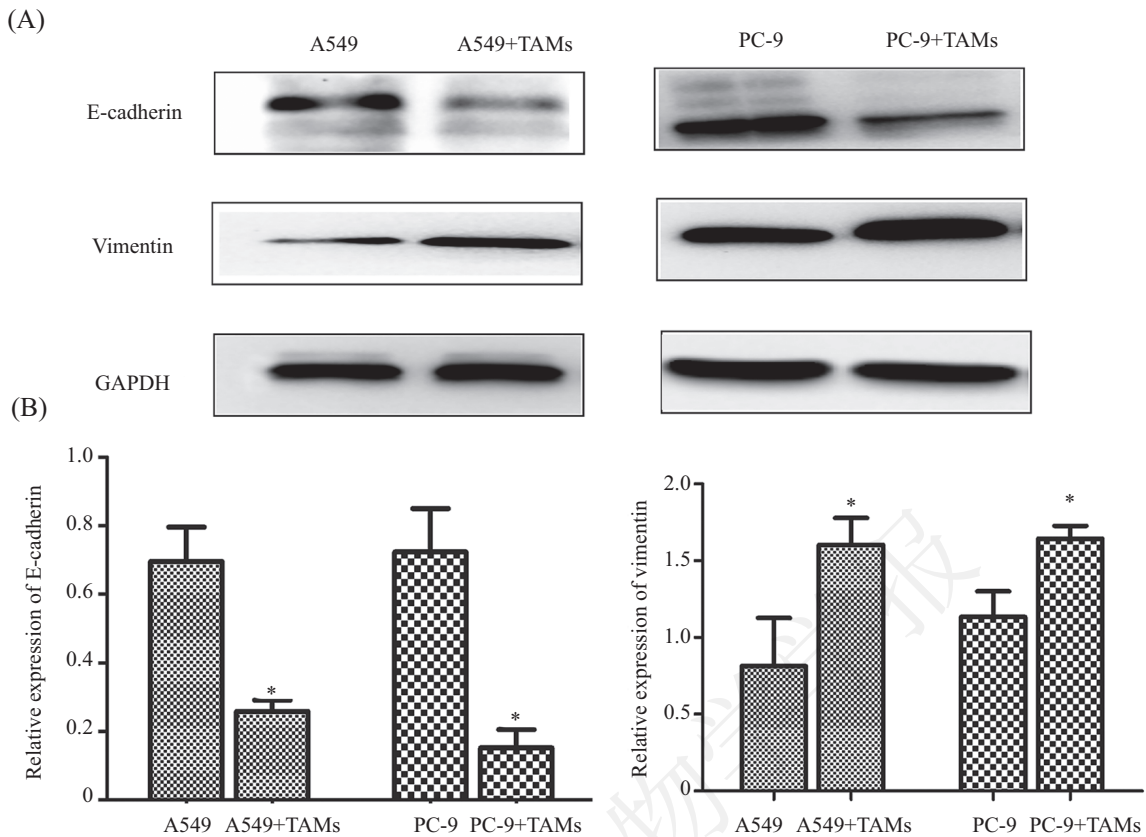


A: Transwell法检测与TAMs共培养后的A549和PC-9细胞侵袭数目; t text, $*P<0.05$ 与对照组相比; B: Transwell法检测与TAMs共培养后的A549和PC-9细胞迁移数目; t text, $*P<0.05$ 与对照组相比。

A: the invasion cells of A549 and PC-9 were detected by Transwell analysis after co-culturing with TAMs; t text, $*P<0.05$ VS control group; B: the migration cells of A549 and PC-9 were detected by Transwell analysis after co-culturing with TAMs; t text, $*P<0.05$ vs control group.

图3 CSE诱导的M2型巨噬细胞促进A549和PC-9细胞发生侵袭迁移

Fig.3 CSE-induced M2 TAMs significantly enhanced the invasion and migration capacity of A549 and PC-9 cells



A、B: Western blot检测E-cadherin和vimentin蛋白质相对表达水平。*t* text, **P* < 0.05与对照组相比。

A,B: expression level of E-cadherin and vimentin were determined by Western blot. *t* text, **P* < 0.05 vs control group.

图4 CSE诱导的M2型巨噬细胞促进A549和PC-9细胞发生EMT

Fig.4 CSE-induced M2 TAMs significantly enhanced EMT of A549 and PC-9 cells

细胞数目显著高于对照组($P < 0.05$)。结果表明, CSE诱导的THP-1细胞可以促进PC-9和A549细胞的侵袭和迁移能力。

2.4 CSE诱导的M2型巨噬细胞促进A549和PC-9细胞发生EMT

将CSE处理96 h后的THP-1细胞分别与A549或PC-9细胞共培养72 h。Western blot检测TAMs对A549和PC-9细胞EMT相关蛋白的影响。A549+TAMs组及PC-9+TAMs组Vimentin蛋白的表达水平上升, 而E-cadherin蛋白的表达水平下降($P < 0.05$, 图4)。结果表明, CSE活化的TAMs可以促进EMT过程, 进而促进其侵袭转移的发生。

3 讨论

肿瘤相关的巨噬细胞是肿瘤微环境中主要的炎性细胞。在肿瘤中有两种极化表型, 一种是经典活化的巨噬细胞(M1), 另一种是替代途径活化的巨噬细胞(M2)^[11]。M1型巨噬细胞以促进免疫原性的

方式激活炎症和消除感染, 具有较强的杀菌能力和抗原提呈能力。M2型巨噬细胞具有清除碎片、促进血管生成、组织重塑和修复等功能, 被认为是肿瘤的促进细胞^[12-13]。Yuan等^[6]和Fu等^[14]的研究表明, CSE可以促进M2型TAMs的生成。在本研究中, CSE刺激THP-1细胞96 h后, CD163⁺细胞的比例增加, 同时TGF- β 的分泌量增加, 而TNF- α 、IL-12的分泌量下降, 提示在mRNA和细胞表型两个方面均证明, CSE可促进THP-1细胞向M2型TAMs方向极化, 这与文献报道的结论一致。

STAT6是参与M2型巨噬细胞极化的主要转录因子和信号分子。STAT6磷酸化形成p-STAT6, 并通过二聚体化及核转位, 促使巨噬细胞的M2型极化^[15]。在肺纤维化中, 通过抑制JAK1/STAT6的活化, 从而抑制M2型巨噬细胞的极化, 改善肺纤维化的进展^[16]。在动脉粥样硬化中, 通过STAT6的激活促进巨噬细胞向M2亚型分化, 促进了粥样硬化斑块的稳定^[17]。本研究首次发现, CSE处理THP-1细胞96 h后, 磷酸

化的STAT6被激活。这提示, STAT6通路可能参与CSE对THP-1细胞向M2型TAMs方向极化的调控过程。

M2型TAMs对肿瘤的发生发展产生重要作用。Che等^[18]的研究表明, TAMs通过IL-6促进A549和H1299发生EMT。Wang等^[19]研究表明, TAMs通过FUT4/Ezrin促进A549和H1299发生EMT。Yao等^[20]研究发现, TAMs可以促进NSCLC的侵袭转移。在本研究中, CSE先诱导单核细胞活化为TAMs, 活化后的TAMs与NSCLC细胞共培养, 发现TAMs促进NSCLC细胞EMT的发生, 提示CSE诱导活化的M2型TAMs通过改变NSCLC细胞EMT的表型而提高NSCLC侵袭迁移能力。

综上所述, CSE可以将肿瘤微环境中的单核细胞活化为TAMs, 而活化后的TAMs又具有促肿瘤侵袭转移的作用, 本实验通过逆转巨噬细胞极化的方式, 为治疗肺癌奠定一定的基础。同时这些结果提示, CSE不仅仅影响肿瘤细胞固有的黏附和侵袭能力, 还可通过将巨噬细胞极化成M2表型的途径进而促进肿瘤转移。因此吸烟不仅会影响癌细胞, 还会影响巨噬细胞的功能, 故此研究建议人群戒烟。

参考文献 (References)

- 1 Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH. Cancer statistics 2016. *CA Cancer J Clin* 2016; 66(1): 7-30.
- 2 Petty AJ, Yang Y. Tumor-associated macrophages: implications in cancer Immunotherapy. *Immunotherapy* 2017; 9(3): 289-302.
- 3 Greillier L, Cortot AB, Viguier J, Brignoli-Guibaudet L, Lhomel C, Eisinger F, *et al.* Perception of lung cancer risk: impact of smoking status and nicotine dependence. *Curr Oncol Rep* 2018; 20(Suppl 1): 18.
- 4 Ezzati M, Henley SJ, Lopez AD, Thun MJ. Role of smoking in global and regional cancer epidemiology: current patterns and data needs. *Int J Cancer* 2005; 116(6): 963-71.
- 5 Kunz LI, Lapperre TS, Snoeck-Stroband JB, Budulac SE, Timens W, van Wijngaarden S, *et al.* Smoking status and anti-inflammatory macrophages in bronchoalveolar lavage and induced sputum in COPD. *Respir Res* 2011; 12(1): 34.
- 6 Yuan F, Fu X, Shi H, Chen G, Dong P, Zhang W. Induction of murine macrophage M2 polarization by cigarette smoke extract via the JAK2/STAT3 pathway. *PLoS One* 2014; 9(9): e107063.
- 7 Li D, Zhang L, Zhou J, Chen H. Cigarette smoke extract exposure induces EGFR-TKI resistance in EGFR-mutated NSCLC via mediating Src activation and EMT. *Lung Cancer* 2016; 93: 35-42.
- 8 Bremnes RM, Veve R, Gabrielson E, Hirsch FR, Baron A, Bemis L, *et al.* Highthroughput tissue microarray analysis used to evaluate biology and prognostic significance of the E-cadherin pathway in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20(10): 2417-28.
- 9 Chen H, Liao K, Cui ZL, Qiang WF, Feng ZX, Ping WF, *et al.* Cigarette smoke extract induces apoptosis of rat alveolar Type II cells via the PLTP/TGF- β 1/Smad2 pathway. *Int Immunopharmacol* 2015; 28(1): 707-14.
- 10 Hao NB, Lü MH, Fan YH, Cao YL, Zhang ZR, Yang SM. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immuno* 2012; 2012: 948098.
- 11 Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(12): 953-64.
- 12 Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: Tumor associated macrophages as a paradigm for polarized m2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 2002; 23(11): 549-55.
- 13 Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: Balance, tolerance, and Diversity. *Curr Opin Immunol* 2010; 22(2): 231-7.
- 14 Fu X, Shi H, Qi Y, Zhang W, Dong P. M2 polarized macrophages induced by CSE promote proliferation, migration, and invasion of alveolar basal epithelial cells. *Int Immunopharmacol* 2015; 28(1): 666-74.
- 15 LaPorte SL, Juo ZS, Vaclavikova J, Colf LA, Qi X, Heller NM, *et al.* Molecular and structural basis of cytokine receptor pleiotropy in the interleukin-4/13 system. *Cell* 2008; 132(2): 259-72.
- 16 Tao B, Jin W, Xu J, Liang Z, Yao J, Zhang Y, *et al.* Myeloid-specific disruption of tyrosine phosphatase Shp2 promotes alternative activation of macrophages and predisposes mice to pulmonary fibrosis. *J Immunol* 2014; 193(6): 2801-11.
- 17 Gong M, Zhuo X, Ma A. STAT6 upregulation promotes M2 macrophage polarization to suppress atherosclerosis. *Med Sci Monit Basic Res* 2017; 23: 240-9.
- 18 Dehai C, Bo P, Qiang T, Lihua S, Fang L, Shi J, *et al.* Enhanced invasion of lung adenocarcinoma cells after co-culture with THP-1-derived macrophages via the induction of EMT by IL-6. *Immunol Lett* 2014; 160(1): 1-10.
- 19 Wang A, Lu C, Ning Z, Gao W, Xie Y, Zhang N, *et al.* Tumor-associated macrophages promote Ezrin phosphorylation-mediated epithelial-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma through FUT4/LeY up-regulation. *Oncotarget* 2017; 8(17): 28247-59.
- 20 Yao Z, Zhang J, Zhang B, Liang G, Chen X, Yao F, *et al.* Imatinib prevents lung cancer metastasis by inhibiting M2-like polarization of macrophages. *Pharmacol Res* 2018; 133: 121-31.