

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.11.002

甲氨蝶呤诱导巨噬细胞 M1 极化促进骨肉瘤细胞凋亡的实验研究 *

尹芳芳 许磊晶 贺美娟 王 悍[△]

(上海交通大学附属第一人民医院放射科 上海 200080)

摘要 目的:探讨甲氨蝶呤诱导巨噬细胞分化情况和分化后巨噬细胞对骨肉瘤细胞凋亡的影响。**方法:**采用甲氨蝶呤刺激小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞 24 小时后,使用流式、免疫荧光等技术检测 M1 型巨噬细胞标志物 CD86、诱导型一氧化氮合酶(Inducible nitric oxide synthase, iNOS)的表达量,并以脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)诱导巨噬细胞极化为阳性对照,未处理细胞为阴性对照,评估甲氨蝶呤的诱导效果。将经甲氨蝶呤刺激的巨噬细胞与骨肉瘤细胞 K7 共培养,使用流式技术检测骨肉瘤细胞 K7 凋亡程度。**结果:**一定剂量的甲氨蝶呤作用于小鼠单核巨噬细胞后,可以显著上调 M1 型巨噬细胞的标志物 CD86、iNOS,上调程度与 LPS 组相当。与脂多糖诱导巨噬细胞极化类似,甲氨蝶呤可以激活 NF- κ B。经甲氨蝶呤刺激后的巨噬细胞可以促进骨肉瘤细胞的凋亡。**结论:**甲氨蝶呤诱导向 M1 型分化的巨噬细胞可以促进骨肉瘤细胞的凋亡。

关键词:甲氨蝶呤;巨噬细胞;骨肉瘤

中图分类号:R-33;R738.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)11-2006-06

Experimental Study of Methotrexate Induced M1 Polarization of Macrophages to Promote Apoptosis of Osteosarcoma Cells*

YIN Fang-fang, XU Lei-jing, HE Mei-juan, WANG Han[△]

(Department of Radiology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the differentiation in methotrexate-induced macrophages and the effect of the macrophages on apoptosis of osteosarcoma cells. **Methods:** Macrophages were stimulated with methotrexate for 24 hours. The expressions of CD86 and inducible nitric oxide synthase, which are markers of M1-like macrophages, were respectively detected by flow cytometry and immunofluorescence. To evaluate the effect of methotrexate on the polarization of macrophages, lipopolysaccharide, LPS, was adopted as a positive control, and untreated cells were used as a negative control. The macrophages, stimulated with MTX, were co-cultured with osteosarcoma cells to assess the effects of the macrophages on the apoptosis of osteosarcoma cells. The rates of apoptosis in osteosarcoma cells were detected by Flow cytometry. **Results:** After co-cultured with methotrexate, the expression of M1-like macrophage' markers, such as CD86 and iNOS in macrophages was significantly up-regulated, and the degree of upregulation is comparable to that of the LPS group. Similar to LPS-induced macrophage' polarization, methotrexate can cause NF- κ B activation. Macrophages stimulated by methotrexate can increase the apoptosis rate of osteosarcoma cells. **Conclusion:** Methotrexate can induce macrophages to differentiate into M1 like and differentiated macrophages can promote the apoptosis of osteosarcoma cells.

Key words: Methotrexate; Macrophage; Osteosarcoma

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R738.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)11-2006-06

前言

诸多新近研究表明,巨噬细胞在多种实体肿瘤的发生发展中起到至关重要的作用。巨噬细胞具有很强的可塑性,受到不同的刺激可以改变极化状态,M1 型巨噬细胞与 M2 型巨噬细胞的激活途径以及所执行的功能不同。M1 型巨噬细胞可以对肿瘤起到一定程度的抑制作用,而 M2 型巨噬细胞可以促进肿瘤的发生以及进展^[1]。其中 M1 型巨噬细胞的极化通常与 Toll

样受体激动剂 - 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的作用有关。M1 型巨噬细胞可以产生 IL-6、iNOS、TNF- α 等因子抑制肿瘤的生长^[2-3]。而在肿瘤微环境中的巨噬细胞多为 M2 型,可以通过促进肿瘤血管形成、帮助肿瘤实现免疫逃避、转移等机制促进肿瘤的发生发展^[4]。因此,诱导巨噬细胞向 M1 型分化可以作为肿瘤免疫治疗的新策略。骨肉瘤是最常见的原发性恶性骨肿瘤,儿童及青少年是其易感人群^[5],骨肉瘤的常规治疗手段包括手术以及化疗^[6]。但是,化疗药存在毒副作用,如高剂量的甲氨

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81871400);上海市优秀技术带头人计划项目(2017XD1424200);

上海市卫生计生系统优秀学科带头人计划项目(2017BR038)

作者简介:尹芳芳(1994-),女,硕士研究生,主要研究方向:肿瘤分子影像学,E-mail: 643952627@qq.com,电话:18317181057

[△] 通讯作者:王悍,E-mail: han.wang@shsmu.edu.cn,电话:021-63071422

(收稿日期:2020-02-27 接受日期:2020-03-21)

蝶呤(methotrexate, MTX)具有肾毒性,阿霉素的心脏毒性等不容忽视,而且骨肉瘤极易发生化疗耐药^[7]。因此,亟需使用新的治疗方法和药物来进一步改善当前化疗疗效。基于以上研究,我们设想甲氨蝶呤对巨噬细胞极化起到调节作用,进而研究极化后的巨噬细胞对于骨肉瘤细胞的影响以探究骨肉瘤细胞治疗的新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞购买于上海中科院细胞库,小鼠骨肉瘤细胞由上海市第一人民医院骨肿瘤研究所尹飞研究员提供;胎牛血清购自 Gibco 公司;DMEM 细胞培养液购自美国 Hyclone 公司;胰酶、双抗(青霉素+链霉素)购自杭州吉诺生物科技有限公司;CCK-8 试剂盒购买于日本同仁公司;Anti-mouse CD86 以及 CD11b 流式抗体购买于杭州联科生物技术有限公司;LPS 购自 Proptein 公司;甲氨蝶呤购买于 BBL 公司;免疫荧光固定液、通透液、封闭液、一抗及二抗稀释液购买于碧云天公司;WB 凝胶制备试剂盒、电泳缓冲液、转膜液购自上海雅酶生物科技有限公司;小鼠 iNOS 抗体、NF- κ B 抗体组合购买于 CST 公司;流式凋亡试剂检测盒购买于 BD 公司。荧光显微镜(Leica DMI6000B,德国)用于检测荧光,流式细胞仪(BD Accuri C6,美国)用于巨噬细胞表面标志物以及细胞凋亡的检测。

1.2 方法

1.2.1 CCK8 检测细胞毒性 为了明确 MTX 诱导巨噬细胞合适的作用剂量,使用 CCK8 检测不同浓度的调整 RAW264.7 细胞浓度为 1×10^5 ,接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L,设置不同的浓度梯度,每个梯度 6 个复孔,置于细胞培养箱中培养过夜。次日,分别加入不同浓度的 MTX,培养 48 小时。弃去培养液上清,使用 PBS 洗涤细胞 3 次,每孔加入 90 μ L 新鲜细胞培养液以及 10 μ L CCK-8 试剂溶液,于细胞培养箱中培养一定时间后,使用酶标仪测定 450 nm 的波长下的吸光度,根据说明书给出的公式计算出各组细胞存活率。

1.2.2 实验分组 调整 RAW264.7 细胞浓度为 1×10^5 /mL,在六孔板中按照每孔 2 mL 细胞悬液的数量接种小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 细胞。为了研究甲氨蝶呤是否可以诱导巨噬细胞向 M1 型分化,将 RAW264.7 细胞分为 3 组:未给予任何刺激的一组为阴性对照组,Blank 组;根据经典诱导方式^[8],添加 LPS (100 ng/mL)组为 LPS 组,作为阳性对照组;根据 MTX 应用于 RAW264.7 细胞时的细胞毒性分析结果,添加 MTX (0.5 μ g/mL)组为实验组 --MTX 组,置于 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱中培养 24 小时。

1.2.3 流式检测巨噬细胞 CD86 表达实验 收集不同处理的细胞,用流式缓冲液(5% FBS+95% PBS)调整细胞数量为 1×10^7 /mL,每组各取 90 μ L,分别加入 5 μ L 的 Anti-Mouse CD86 以及 Anti-Mouse CD11b,使其终体积为 100 μ L,震荡混匀。室温下避光孵育 20 分钟后,每管加入 1 mL 流式缓冲液,离心弃上清,加入 500 μ L 流式缓冲液重悬,待上机检测。

1.2.4 免疫荧光检测 iNOS 表达 将 RAW264.7 细胞按照 1×10^5 /mL 的密度接种于共聚焦皿中,在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养过夜。待细胞贴壁后,分别不加或者加入 LPS、MTX(剂量同 1.2.2)继

续孵育 24 小时后,弃去培养液上清,弃去培养液上清,PBS 洗涤 3 次,每次 3 分钟,固定通透后,室温封闭 1 小时,后加入 iNOS 一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,PBS 洗涤 3 次后,室温孵育 FITC 标记的抗兔荧光二抗 1 小时,PBS 洗涤 3 次,加 DAPI 染色 5 分钟后,加入 PBS 洗涤 3 次后,于荧光显微镜下观察。

1.2.5 Western Blot 检测 NF- κ B 相关蛋白的表达 收集六孔板中不同处理的 RAW264.7 细胞,使用 PBS 冲洗 3 次后,每孔加入 100 μ L 蛋白裂解液(混有蛋白酶抑制剂)于冰上裂解 10 分钟,12000 rpm,4 $^{\circ}$ C 离心 20 分钟,吸取 80 μ L 上清于新的 EP 管中,加入 20 μ L 的 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液,充分混匀,置于 100 $^{\circ}$ C 水中煮 10 分钟。蛋白定量后,进行电泳以及转膜,用 5%脱脂奶粉室温封闭 1 小时后,4 $^{\circ}$ C 孵育 NF- κ B p-p65、actin、I κ B- α (1/1000 比例稀释)过夜。PBST 洗涤条带 3 次,每次 10 分钟,室温下孵育二抗 1 小时,后洗涤条带,滴加 ECL 发光液进行显影。

1.2.6 流式检测不同处理组巨噬细胞对骨肉瘤 K7 细胞凋亡影响 使用 Transwell 培养板(0.4 μ m,Corning,美国)将不同处理组 RAW264.7 细胞与 K7 细胞共同培养 48 小时后,收集下室的 K7 细胞培养液上清,使用不含 EDTA 的胰酶消化细胞,使用收集的培養液上清终止消化,离心,PBS 洗涤后,使用流式凋亡试剂盒中的 Binding buffer (使用 ddH₂O 稀释为 1X 溶液)重悬,取 100 μ L 细胞悬液,设置未染色组以及 FITC、PI 单染组用于调节补偿,其余各组加入 Annexin V-FITC 5 μ L 以及 PI 5 μ L,混匀后室温下避光孵育 20 分钟后,加入 400 μ L 1 $\times$ Binding buffer 混匀,上机待检。

1.3 统计学分析

所有的定量数据使用 GraphPad Prism 7.04 进行分析,两组组间差异使用 t 检验, $P < 0.05$ 具有统计学差异。

2 结果

2.1 不同浓度甲氨蝶呤作用后对细胞活性的影响

用不同浓度 (0.5、1、5、10、100 μ g/mL) 的 MTX 处理 RAW264.7 细胞 48 小时后,CCK-8 检测细胞活性。结果显示,MTX 浓度为 0.5 μ g/mL 时细胞存活率仍在 80%以上,见图 1。据此,我们选定 1 μ M 的浓度刺激巨噬细胞极化,对巨噬细胞的增殖不会产生影响。此外,考虑到上述 MTX 浓度梯度可能不会对 K7 细胞产生明显的毒性,将 MTX 的浓度梯度提高后,再与小鼠骨肉瘤 K7 细胞孵育,进行了 K7 细胞增殖活性检测。结果显示,MTX 浓度为 100 μ g/mL 时,才会对细胞增殖产生明显影响($P < 0.05$),见图 2。由此可见,用于诱导 RAW264.7 细胞分化的 MTX 剂量不会对 K7 细胞的增殖产生影响,从而保证 MTX 对后续 K7 细胞凋亡的检测不会产生干扰。

2.2 MTX 作用后巨噬细胞 M1 型标志物 CD86、iNOS 表达上调

共刺激分子 CD11b 可以用来标记巨噬细胞,CD86 是 M1 型巨噬细胞的标志物之一^[9]。我们使用流式检测了未受任何刺激的巨噬细胞以及 LPS、MTX 孵育 24 小时后的巨噬细胞 CD86 的表达情况。结果如图 3 所示,Blank 组中 CD11b⁺CD86⁺ 细胞的比例为 (8.5 $\pm$ 1.45)%,LPS 组中比例为 (17.3 $\pm$ 0.45)%,MTX 组中双阳性细胞的比例为 (35.9 $\pm$ 4.4)%。相比于 Blank 组,LPS 组中双阳性细胞比例明显增加($P < 0.05$),而与 LPS 组相比,MTX 组中双阳性细胞比例明显增加($P < 0.05$)。

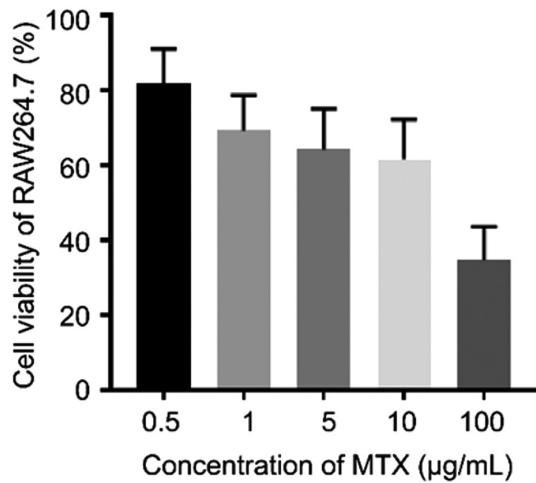


图1 不同浓度的MTX对RAW264.7细胞增殖的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of MTX on proliferation of RAW264.7 cells

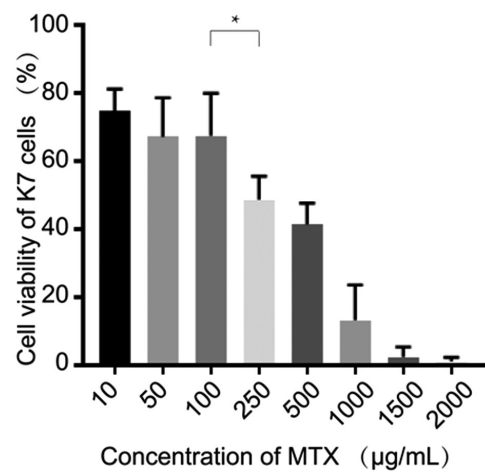


图2 不同浓度的MTX对K7细胞增殖的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of MTX on proliferation of K7 cells

*: $P < 0.05$

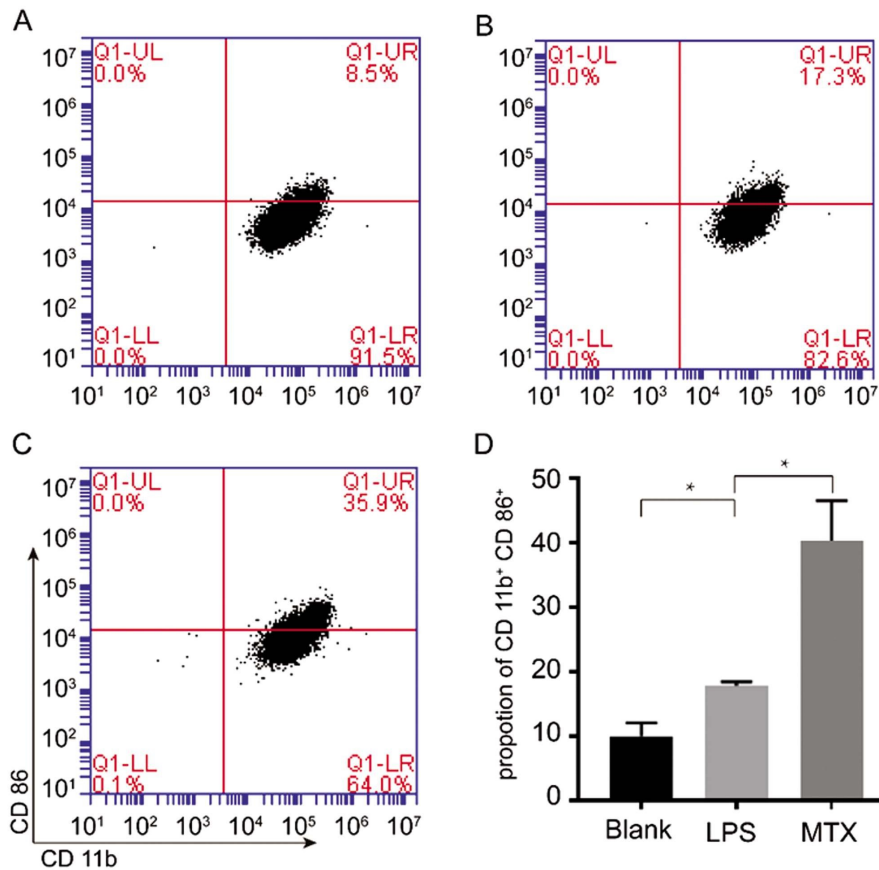


图3 不同处理组的巨噬细胞CD86表达情况

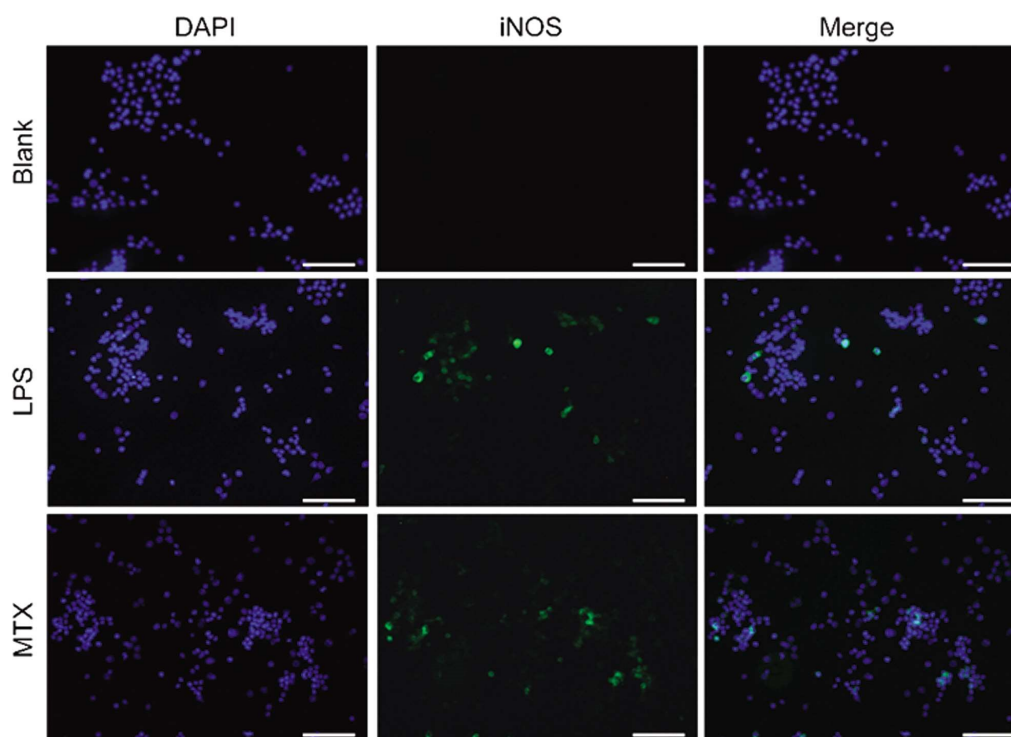
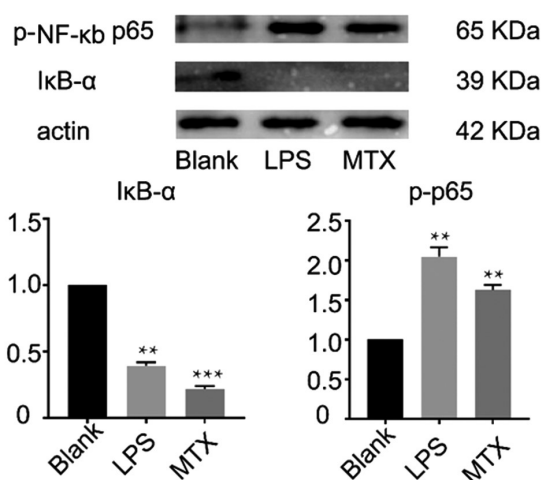
Fig.3 CD86 expression in macrophages of different treatment groups

A为Blank组巨噬细胞,B为LPS组巨噬细胞,C为MTX组,D为统计分析结果。*: $P < 0.05$

除CD86外,LPS刺激巨噬细胞产生的iNOS也是常用的鉴别M1型巨噬细胞的标志物^[10]。我们采用免疫荧光染色观察各处理组巨噬细胞表达iNOS的结果,如图4所示。Blank组中未见明显的iNOS表达,LPS组与MTX组巨噬细胞中可以见到明显的表达。

我们进一步探究了MTX诱导巨噬细胞分化的可能机制。

LPS通常是通过激活NF- κ B的途径诱导巨噬细胞分化^[11]。我们采用蛋白免疫印迹(Western Blot, WB)技术检测了NF- κ B p65磷酸化蛋白以及I κ B- α 的表达,结果如图5所示,可以看到LPS组与MTX组中p-p65蛋白的表达与Blank组相比,具有明显升高($P < 0.01$)。与Blank组相比,LPS组与MTX组中I κ B- α 蛋白的降解明显($P < 0.01, P < 0.001$)。

图4 不同处理组的巨噬细胞 CD86 表达情况, 图中标尺代表 100 μm Fig.4 iNOS expression in macrophages of different treatment groups. Scale bar=100 μm 图5 不同处理组的巨噬细胞中 NF- κ B 的激活情况Fig.5 Activation of NF- κ B in macrophages in different treatment groups*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

2.3 甲氨蝶呤诱导巨噬细胞分化促进骨肉瘤 K7 细胞的凋亡

为了进一步验证,经甲氨蝶呤极化的巨噬细胞是否可以起到抑制肿瘤的作用,我们使用流式技术检测与不同处理巨噬细胞共同孵育后的 K7 细胞的凋亡情况。结果如图 6 示,与 Blank 组巨噬细胞共孵 24 小时后 K7 细胞凋亡率为 $(1 \pm 0.2)\%$,与 LPS 组巨噬细胞及 MTX 组巨噬细胞共孵后 K7 细胞凋亡率分别为 $(10.85 \pm 0.84)\%$ 和 $(12.95 \pm 0.45)\%$ 。LPS 组与 MTX 组和 Blank 组比较差异都有统计学意义 ($t=11.28, 24.27, P < 0.01$)。

3 讨论

巨噬细胞是机体先天免疫系统的重要组成部分,与动脉粥

样硬化、风湿性关节炎、肿瘤等多种疾病的发生发展有着密切的联系^[12]。此外,近年来,不少研究者发现化疗药物对于巨噬细胞极化产生影响。例如,伊马替尼可以在体外抑制 M2 型巨噬细胞的极化,进而预防肺癌的转移^[13],双膦酸盐可以诱导 M2 型巨噬细胞向 M1 型分化^[14],卢比克丁可以通过耗减小鼠胰腺癌中的肿瘤相关巨噬细胞从而增强吉西他滨的治疗作用^[15],曲贝替定可以选择性地消耗小鼠肿瘤模型中的巨噬细胞同时可以减少血管的生成^[16]。由此可见,化疗药物对于机体的免疫系统会产生一定的影响。有部分化疗药物可以实现肿瘤治疗的同时可以作为多种炎症以及自身免疫疾病的治疗剂,例如,甲氨蝶呤作为类风湿性关节炎的一线药物,还可以用于强直性脊柱炎、系统性硬化、炎症性肠病等^[17]。因此,通过甲氨蝶呤或许可以调节巨噬细胞极化状态从而在肿瘤的治疗中发挥一定的作用。

我们通过流式、免疫荧光等技术证明,一定剂量的甲氨蝶呤可以使得 CD86、iNOS 表达上调。以上结果证明甲氨蝶呤可以在一定程度上诱导巨噬细胞向 M1 型分化。在巨噬细胞向 M1 型分化过程中,NF- κ B 通路起关键作用。NF- κ B 被激活后,I κ B- α 降解,p65 完成磷酸化,便易位至细胞核,以促进促炎性细胞因子的产生,如 iNOS 表达上调,产生一氧化氮^[18]。我们通过检测 NF- κ B 相关蛋白表达情况,推测甲氨蝶呤可能通过激活 NF- κ B 来实现巨噬细胞的极化。但也有研究认为,低剂量的甲氨蝶呤可以通过下调 NF- κ B 通路抑制肝脏炎症的发生^[9],与该研究不同的是,我们使用的药物剂量以及使用的细胞系不同,或许是这些差异导致了研究结果的不同。将极化后的巨噬细胞与骨肉瘤细胞体外共培养后,结果显示,极化后的巨噬细胞可以促进骨肉瘤细胞的凋亡,这也证实了前面所述,"M1" 型巨噬细胞可以起到抑制肿瘤的作用。

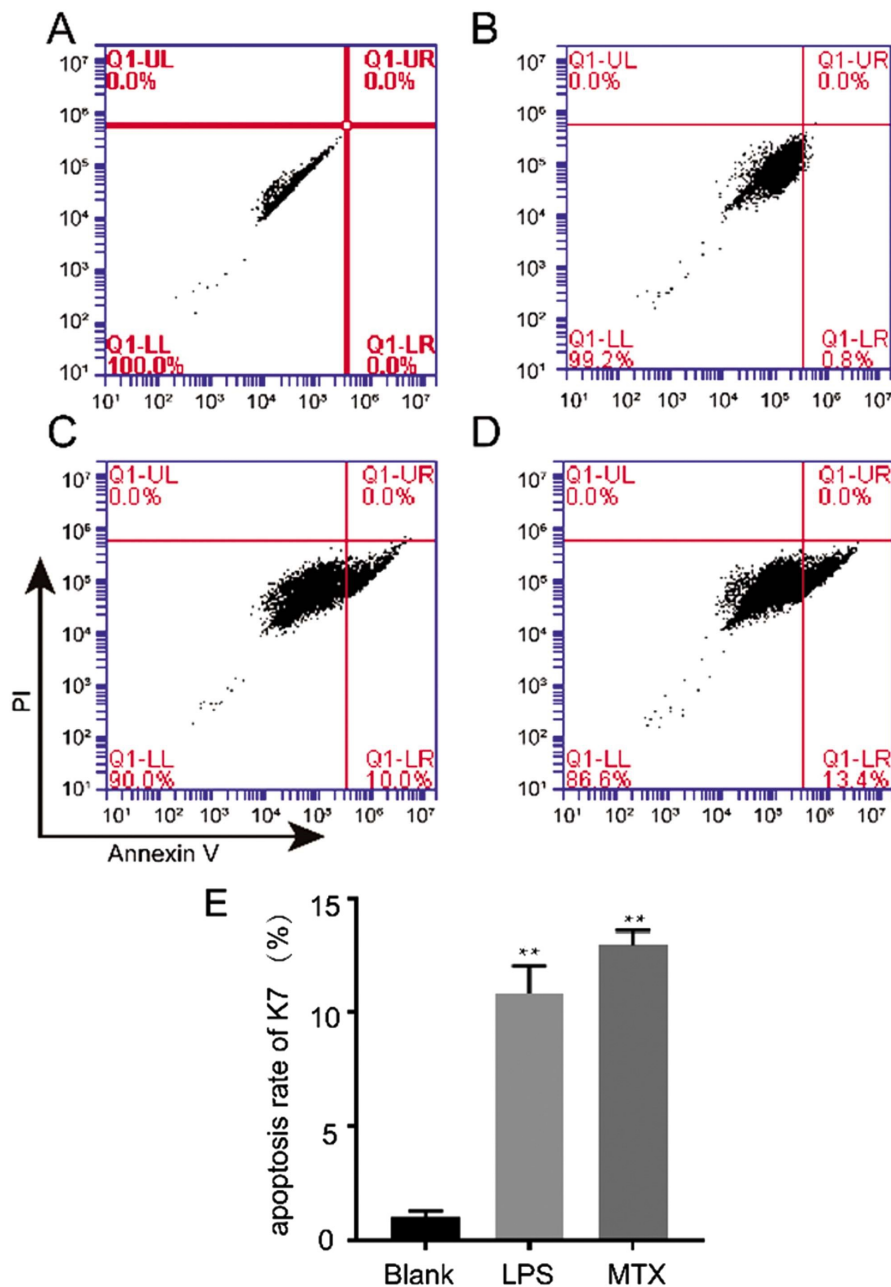


图 6 与不同处理组的巨噬细胞共同培养后, K7 细胞凋亡情况

Fig. 6 K7 cell apoptosis after co-culture with macrophages from different treatment groups

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

近年来,以细胞治疗为代表的免疫疗法在肿瘤治疗中显示了较为满意的效果,如过继性 T 细胞凭借其来源于宿主自身体内从而可以避免不良的免疫排斥反应以及具有较强的抗肿瘤效果^[20]。此外,上文中涉及的肿瘤微环境中的巨噬细胞等抗原呈递细胞对于 T 细胞发挥作用起到了至关重要的作用^[21]。因此,针对肿瘤免疫微环境的免疫治疗或许可以为肿瘤的治疗带来新的希望,我们的研究也为骨肉瘤的免疫治疗提供了新思路。然而,骨肉瘤治疗的一个重大问题是早期的肺转移,针对这一点,有研究表明,甲氨蝶呤可以抑制肿瘤相关巨噬细胞的 M2 极化达到预防骨肉瘤肺转移的发生^[22]。我们下一步将针对骨肉瘤肺转移进行巨噬细胞极化的研究以探索是否可以达到更好的治疗效果。

参考文献(References)

- [1] Sica Antonio, Erreni Marco, Allavena Paola, et al. Macrophage polarization in pathology [J]. Cellular and molecular life sciences: CMLS, 2015, 72(21): 4111-4126
- [2] Shapouri-Moghaddam Abbas, Mohammadian Saeed, Vazini Hossein, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease[J]. Journal of Cellular Physiology, 2018, 233(9): 6425-6440
- [3] Chen Yibing, Song Yucen, Du Wei, et al. Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression[J]. Journal of biomedical science, 2019, 26(1): 78-78
- [4] Komohara Yoshihiro, Fujiwara Yukio, Ohnishi Koji, et al. Tumor-associated macrophages: Potential therapeutic targets for anti-cancer therapy[J]. Adv. Drug Delivery Rev, 2016, 99: 180-185

- [5] Isakoff M S, Bielack S S, Meltzer P, et al. Osteosarcoma: Current Treatment and a Collaborative Pathway to Success [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(27): 3029-3035
- [6] Anninga Jakob K, Gelderblom Hans, Fiocco Marta, et al. Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma: where do we stand? [J]. *European journal of cancer* (Oxford, England : 1990), 2011, 47(16): 2431-2445
- [7] Hattinger Claudia Maria, Fanelli Marilù, Tavanti Elisa, et al. Advances in emerging drugs for osteosarcoma [J]. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 2015, 20(3): 495-514
- [8] Tan Rui-Zhi, Liu Jian, Zhang Ying-Ying, et al. Curcumin relieved cisplatin-induced kidney inflammation through inhibiting Mincle-maintained M1 macrophage phenotype [J]. *Phytomedicine*, 2019, 52: 284-294
- [9] Liu Xiao-Lin, Pan Qin, Cao Hai-Xia, et al. Lipotoxic Hepatocyte-Derived Exosomal miR-192-5p Activates Macrophages via Ric- tor/Akt/FoxO1 Signaling in NAFLD [J]. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 2019
- [10] Orecchioni Marco, Ghosheh Yanal, Pramod Akula Bala, et al. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2 (LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages [J]. *Frontiers in immunology*, 2019, 10: 1084-1084
- [11] Luo Dan, Guo Yumeng, Cheng Yuanyuan, et al. Natural product celastrol suppressed macrophage M1 polarization against inflammation in diet-induced obese mice via regulating Nrf2/HO-1, MAP kinase and NF- κ B pathways [J]. *Aging*, 2017, 9(10): 2069-2082
- [12] Zigmond Richard E, Echevarria Franklin D. Macrophage biology in the peripheral nervous system after injury [J]. *Progress in neurobiology*, 2019, 173: 102-121
- [13] Yao Zhangting, Zhang Jieqiong, Zhang Bo, et al. Imatinib prevents lung cancer metastasis by inhibiting M2-like polarization of macrophages [J]. *Pharmacological Research*, 2018, 133: 121-131
- [14] Rogers Thea L, Holen Ingunn. Tumour macrophages as potential targets of bisphosphonates [J]. *Journal of translational medicine*, 2011, 9: 177-177
- [15] Céspedes María Virtudes, Guillén María José, López-Casas Pedro Pablo, et al. Lurbinectedin induces depletion of tumor-associated macrophages, an essential component of its in vivo synergism with gemcitabine, in pancreatic adenocarcinoma mouse models [J]. *Disease models & mechanisms*, 2016, 9(12): 1461-1471
- [16] Germano Giovanni, Frapolli Roberta, Belgiovine Cristina, et al. Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin [J]. *Cancer cell*, 2013, 23(2): 249-262
- [17] Cipriani Paola, Ruscitti Piero, Carubbi Francesco, et al. Methotrexate: an old new drug in autoimmune disease [J]. *Expert Review of Clinical Immunology*, 2014, 10(11): 1519-1530
- [18] Liang Na, Sang Yaxin, Liu Weihua, et al. Anti-Inflammatory Effects of Gingerol on Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Cells by Inhibiting NF- κ B Signaling Pathway [J]. *Inflammation*, 2018, 41(3): 835-845
- [19] 蔡文倩. 低剂量甲氨蝶呤通过阻断 NF- κ B 路径抑制肝脏炎症 [J], 2013
- [20] Wan Jia, Zhang Xianghong, Liu Tang, et al. Strategies and developments of immunotherapies in osteosarcoma [J]. *Oncology letters*, 2016, 11(1): 511-520
- [21] Wang Zenan, Wang Zhan, Li Binghao, et al. Innate Immune Cells: A Potential and Promising Cell Population for Treating Osteosarcoma [J]. *Front. Immunol*, 2019, 10: 1114
- [22] Zhou Qian, Xian Miao, Xiang Sen-feng, et al. All-Trans Retinoic Acid Prevents Osteosarcoma Metastasis by Inhibiting M2 Polarization of Tumor-Associated Macrophages [J]. *Cancer Immunology Research*, 2017, 5(7): 547