文章编号:1000-5404(2007)11-1013-04

论著

不同活化表型的巨噬细胞对Lewis肺癌细胞增殖和侵袭的影响

章必成[1],王 俊[1],赵 勇[2],高建飞[2],郭 燕[1],陈正堂[1] ([1]第三军医大学新桥医院全军肿瘤诊治中心,重庆市肿瘤生物技术研究所,重庆 400037;[2]广州军区武汉总医院肿瘤科,武汉 430070)

提 要: 目的 探讨不同活化表型的小鼠巨噬细胞对小鼠Lewis肺癌(LLC)细胞增殖和侵袭的影响。**方法** 分别以mr IFN-γ+LPS、mr IL-4处理小鼠RAW264.7巨噬细胞,24 h后以RT-PCR鉴定它们表达经典活化的巨噬细胞(caMphi)或替代性活化的巨噬细胞(aaMphi)的标识iNOS或Fizz1的情况。采用Transwell系统共培养活化的巨噬细胞(分为4组:空白对照组、caMphi组、aaMphi组、RAW264.7组)和LLC细胞,绘制LLC细胞生长曲线,并以免疫细胞化学法检测LLC细胞表达血管内皮生长因子-C(VEGF-C)情况,以硝酸还原酶法检测培养液上清中NO含量。分别采用^{3}H-TdR掺入法和Transwell侵袭模型观察活化的巨噬细胞对LLC细胞增殖和侵袭的影响。**结果** 成功地建立了小鼠caMphi和aaMphi模型。在4个共培养组中,aaMphi组的LLC细胞生长最快,表达VEGF-C最强,RAW264.7组次之;caMphi组大量分泌NO,其余3组未见NO分泌。通过^{3}H-TdR掺入法和Transwell侵袭模型观察到,aaMphi组的LLC细胞增殖速度最快,侵袭能力最强;RAW264.7组次之;caMphi组的LLC细胞的增殖和侵袭则受到抑制。**结论** aaMphi能够促进LLC细胞的增殖和侵袭,与其上调后者表达VEGF-C有关;caMphi能够抑制LLC细胞的增殖和侵袭,与其大量分泌NO有关。在与LLC细胞共培养后,RAW264.7细胞的功能朝着aaMphi的方向极化。

关键词: 巨噬细胞;活化表型;Lewis肺癌;增殖;侵袭
中图法分类号: R392.12; R730.2; R734.2 **文献标识码**: A

Effect of macrophages with different activated phenotype on proliferation and invasion of Lewis lung carcinoma cells

ZHANG Bi-cheng[1], WANG Jun[1], ZHAO Yong[2], GAO Jian-fei[2], GUO Yan[1], CHEN Zheng-tang[1] ([1]Cancer Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; [2]Department of Oncology, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command, Wuhan 430070, China)

Abstract: Objective To explore the effect of mouse macrophages with different activated phenotype on the proliferation and invasion of mouse Lewis lung carcinoma (LLC) cells. **Methods** RAW264.7 macrophages were treated by mr IFN-γ+LPS or mr IL-4 for 24 h respectively, then identified by RT-PCR to detect iNOS--the marker of classically activated macrophages (caMphi) and Fizz1--the marker of alternatively activated macrophages (aaMphi). Based on the co-culture Transwell systems of activated macrophages (4 groups: blank control group, caMphi group, aaMphi group and RAW264.7 group) and LLC cells, cell growth curves of LLC cells were drawn, vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expressions of LLC cells were detected by immunocytochemistry, and NO concentrations of co-culture fluid supernatant were determined by nitrate reductase method. ^{3}H-TdR incorporation and Transwell invasion model were used to observe the effect of activated macrophages on the proliferation and invasion of LLC cells, respectively. **Results** Mouse caMphi and aaMphi models were established successfully. Among the 4 co-culture groups, the growth of LLC cells and VEGF-C expression were the fastest and strongest in aaMphi group, secondary in RAW264.7 group; NO concentration was high in caMphi group, but no NO was determined in the other 3 groups. The proliferation and invasion of LLC cells were promoted most in aaMphi group, then in RAW264.7 group, but inhibited in caMphi group.

基金项目:国家自然科学基金(30371586)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371586)
作者简介:章必成(1976-),男,湖北省黄冈市人,博士研究生,主治医师,主要从事肺癌淋巴管生成方面的研究。电话:13637953258,E-mail:zhangbicheng@sina.com
通讯作者:陈正堂,电话:(023)68755626,E-mail:chenzhengtang@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2006-11-27;**修回日期**:2006-12-18

Conclusion aaMphi can promote the proliferation and invasion of LLC cells by the promotion of VEGF-C expression. caMphi can inhibit them by high level production of NO. After co-culture with LLC cells, the function of RAW264.7 cells may be polarized toward that of aaMphi.

Key words: macrophage; activated phenotype; Lewis lung carcinoma; proliferation; invasion

近10年来,人们逐渐认识到在不同的环境中,巨噬细胞可以发生不同性质的活化,成为具有不同活化表型和功能特征的亚群[1]:①经典活化的巨噬细胞(classically activated macrophages, caMphi);②替代性活化的巨噬细胞(alternatively activated macrophages, aaMphi);③Ⅱ型活化的巨噬细胞。其中,前两者与肿瘤的进展和转移密切相关。肿瘤间质中存在着大量的巨噬细胞,即肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAM),但其活化表型、功能特征和作用机制尚不明确。本研究拟通过观察不同活化表型的巨噬细胞对小鼠Lewis肺癌(Lewis lung carcinoma, LLC)细胞增殖和侵袭的影响,以期为明确TAM在肺腺癌进展和转移过程中的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 DMEM培养基、胎牛血清(FBS)购自Hyclone公司。小鼠重组IFN-γ、小鼠重组IL-4购自Cytolab公司。LPS购自Sigma公司。基质胶购自BD公司。兔抗鼠血管内皮生长因子-C(vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C)抗体、免疫细胞化学试剂盒和DAB试剂盒购自武汉博士德生物工程公司。NO试剂盒购自南京建成生物工程研究所。^{3}H-TdR购自北京原子能研究所。Tripure购于Roche公司,反转录试剂盒购于MBI公司,PCR试剂盒购于TaKaRa公司。

1.1.2 细胞株 小鼠RAW264.7巨噬细胞(以下简称RAW264.7细胞)和小鼠LLC细胞购自美国典型细胞中心。

1.1.3 引物设计 小鼠iNOS、Fizz1和β-actin 3对PCR引物由上海生工公司合成。具体序列如下:小鼠iNOS(191 bp):上游5′-CACGGACGAGACGGATAG-3′,下游5′-GGGAGGAGCTGATGGAGT-3′;小鼠Fizz1(196 bp):上游5′-GCCAATCCAGCTAACTATCC-3′,下游5′-CAGTGGTCCAGTCAACGAG-3′;小鼠β-actin(455 bp):上游5′-CCCTGTATGCCTCTGGTC-3′,下游5′- GTCTTTACGGATGTCAACG -3′。

1.2 方法

1.2.1 小鼠巨噬细胞的活化及表型鉴定 参考Edwards等[2]的方法。取对数生长期的RAW264.7细胞以2×10^5/孔接种于6孔培养板中。待细胞贴壁后,分别以小鼠重组IFN-γ(终浓度100 IU/ml)+LPS(终浓度10 μg/L)、小鼠重组IL-4(终浓度10 IU/ml)处理之,24 h后即可建立起caMphi和aaMphi模型。以未经处理的RAW264.7细胞为对照组。分别收集3组细胞各1×10^7个,用Tripure提取总RNA。取RNA 2 μg进行cDNA合成:70 ℃ 5 min→37 ℃ 5 min→42 ℃ 60 min→70 ℃ 10 min→冰上;PCR扩增:94 ℃预变性1.5 min→94 ℃ 1 min→56 ℃ 1 min→72 ℃ 1 min→72 ℃延伸5 min,34个循环;PCR产物以1.5%琼脂糖凝胶电泳1 h后,扫描图像。每组3个样本。

1.2.2 活化的巨噬细胞与LLC细胞共培养系统的建立 选择孔径为0.4 μm的上室和24孔培养板(下室)建立起Transwell共培养系统。首先在下室内接种1 ml(含细胞1×10^4个)处于对数生长期的LLC细胞,4 h后在上室内接种各种活化表型的巨噬细胞1 ml(含细胞1×10^4个),然后共培养。根据上室内的细胞类型分为:①空白对照组:未接种任何细胞;②caMphi组:接种caMphi;③aaMphi组:接种aaMphi;④RAW264.7组:接种未经处理的RAW264.7细胞。

1.2.2.1 绘制LLC细胞生长曲线 上述各共培养组分别设6个时间平行孔,每个时间点又设3个复孔。每隔24 h、连续6 d分别对下室的LLC细胞进行台盼蓝染色。计算每个时间点的平均活细胞数。以培养时间为横坐标、平均细胞数为纵坐标绘制细胞生长曲线。

1.2.2.2 免疫细胞化学检测LLC细胞VEGF-C表达 在共培养的过程中,将一干净无菌的盖玻片置于培养孔中以制备细胞爬片。24 h后取出该爬片。以兔抗鼠VEGF-C抗体(1∶100)为一抗,以生物素化的羊抗兔IgG为二抗进行免疫细胞化学染色。采用CMIAS-Ⅱ多功能真彩色病理图像分析仪进行光密度测定,其值(IOD)代表VEGF-C阳性表达的相对强度。每个样本选取5个视野(×200),取平均值进行比较。

1.2.2.3 硝酸还原酶法测定共培养液上清NO含量 取共培养24 h后的各组培养液上清严格按试剂盒说明书操作。每组3个样本,取平均值计算。

1.2.3 ^{3}H-TdR掺入法观察LLC细胞增殖状况 于实验前晚将LLC细胞半量换液,实验时取1×10^6个细胞,以不含FBS的培养液洗涤3次,最后将细胞悬浮于0.5 ml完全培养液中;加^{3}H-TdR 3.7×10^5 Bq,放入孵箱孵育3 h,每30分钟轻摇1次;标记结束时加FBS数滴,洗去游离同位素,加完全培养液洗浴30 min,调整细胞浓度2×10^5/ml备用。将不同活化表型的巨噬细胞(同样设为4组,浓度1×10^6/ml)及LLC细胞各1 ml(5∶1)加入Transwell共培养系统(孔径为0.4 μm)的上室和下室中,在孵箱中作用20 h后,多功能低温离心机低速离心5 min收集下室的LLC细胞;加混合酶(0.8%胰酶与0.05% DNA酶对倍稀释而成)1 ml,作用30 min后,用多头细胞收集仪收集细胞于玻璃纤维滤纸上,烘干后放入闪烁杯送检脉冲数(cpm)。cpm代表^{3}H-TdR的掺入量,反映LLC细胞的增殖状况。每组设3个复孔,取其平均值计算。增殖指数(proliferation index, PI)的计算:PI=共培养组的cpm/空白对照组的cpm。

1.2.4 Transwell侵袭模型检测LLC细胞侵袭能力 选择孔径为8 μm的上室和24孔培养板(下室)建立起Transwell侵袭模型,其中上室内铺基质胶30 μg,下室加入1.2.2中各共培养组的培养液上清1 ml。分别将1 ml(含细胞1×10^4个)1.2.2中各共培养组的LLC细胞接种于上室中,24 h后取出上室,用棉签擦去内表面的基质胶和细胞。将其置入95%乙醇中固定10 min,行HE染色。倒置相差显微镜下照相,计数迁移到上室

外表面的细胞数目。以穿膜细胞的相对数目来表示肿瘤细胞的侵袭能力。每个样本计数 5 个视野（×200）的细胞数，取平均值进行比较。

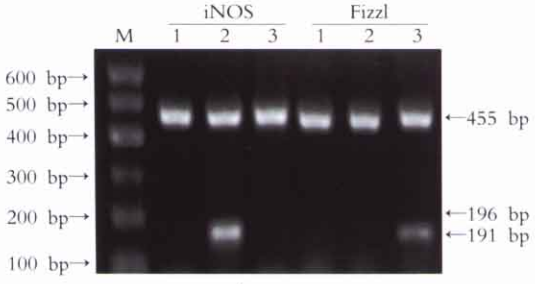
1.3　统计学处理

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　小鼠巨噬细胞的活化及表型鉴定

RT-PCR 显示，3 组均可见明亮的 β-actin 内参照条带且无明显差别；未经处理的 RAW264.7 细胞未见 iNOS 和 Fizz1 条带；IFN-γ + LPS 处理的 RAW264.7 细胞可见明亮的 iNOS 条带，未见 Fizz1 条带；IL-4 处理的 RAW264.7 细胞可见明亮的 Fizz1 条带，未见 iNOS 条带（图 1）。由于 iNOS 和 Fizz1 分别是 caMphi 和 aaMphi 的特异性标识，故本研究再次证实了 IFN-γ + LPS、IL-4 可以分别作为 caMphi 和 aaMphi 的诱导剂。

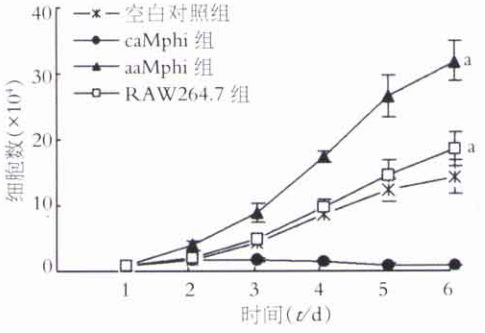


M：DNA 标准；1：对照组；2：caMphi 组；3：aaMphi 组

图 1　不同活化表型的巨噬细胞总 RNA RT-PCR 产物凝胶电泳图

2.2　绘制 LLC 细胞生长曲线

根据各组台盼蓝染色活细胞计数绘制生长曲线如图 2。aaMphi 组和 RAW264.7 组的 LLC 细胞生长速度较快，明显高于空白对照组（$P < 0.05$），其中又以 aaMphi 组最快；而 caMphi 组的 LLC 细胞生长则受到抑制。此结果表明，aaMphi 和 RAW264.7 细胞能够促进 LLC 细胞生长，而 caMphi 则抑制其生长。



a：$P < 0.05$，与空白对照组比较

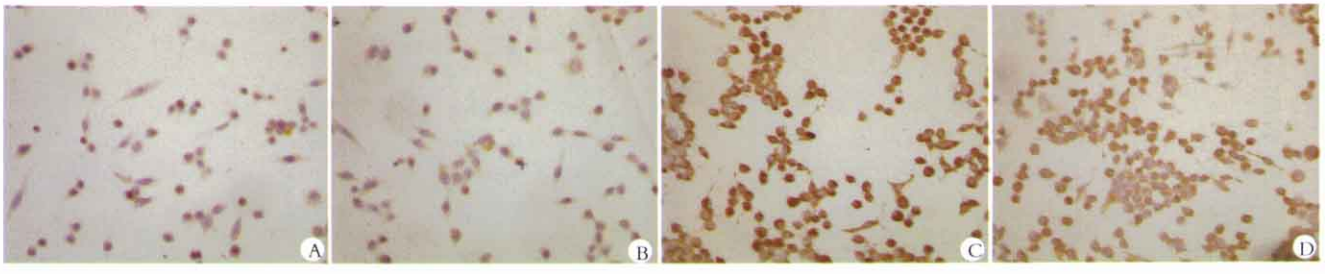
图 2　不同活化表型的巨噬细胞与 LLC 细胞共培养时的细胞生长曲线

2.3　免疫细胞化学检测 LLC 细胞 VEGF-C 表达

相对于空白对照组和 caMphi 组，aaMphi 组和 RAW264.7 组细胞数目较多，且细胞形态稍有改变。4 组 LLC 细胞 VEGF-C 阳性表达情况见图 3，其 IOD 分别为（44.53 ± 8.76）、（42.19 ± 3.52）、（264.19 ± 13.36）和（118.51 ± 10.82）。相对于空白对照组，aaMphi 组和 RAW264.7 组 VEGF-C 表达阳性明显增加（$P < 0.01$），又以 aaMphi 组为最强；caMphi 组和空白对照组无统计学差异（$P > 0.05$）。说明 aaMphi 和 RAW264.7 细胞能够上调 LLC 细胞 VEGF-C 表达。

2.4　硝酸还原酶法测定共培养液上清 NO 含量

caMphi 组的 NO 含量为（234.12 ± 14.83）μmol/L，空白对照组、aaMphi 组和 RAW264.7 组均未能检测到 NO 的产生，说明 caMphi 组能够大量分泌 NO。



A：空白对照组；B：caMphi 组；C：aaMphi 组；D：RAW264.7 组

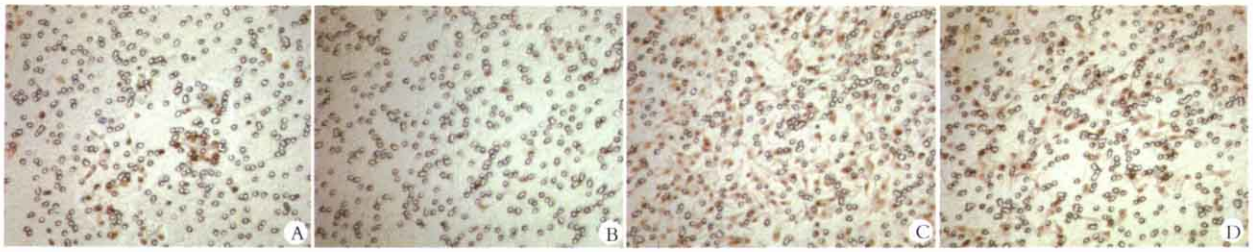
图 3　不同活化表型的巨噬细胞诱导 LLC 细胞表达 VEGF-C 的比较　（SABC ×200）

2.5　^{3}H-TdR 掺入法观察 LLC 细胞增殖状况

caMphi 组、aaMphi 组和 RAW264.7 组 LLC 细胞的 PI 分别为（0.51 ± 0.08）、（2.87 ± 0.43）和（1.17 ± 0.28）。aaMphi 组与 caMphi 组、RAW264.7 组之间均存在统计学差异（$P < 0.01$，$P < 0.05$），RAW264.7 组与 caMphi 组之间也存在着统计学差异（$P < 0.01$），说明 aaMphi 和 RAW264.7 细胞能够促进 LLC 细胞增殖，其中又以 aaMphi 最为明显，而 caMphi 则抑制其增殖。

2.6　Transwell 侵袭模型检测 LLC 细胞侵袭能力

与空白对照组相比，aaMphi 组的透膜细胞明显增多（$P < 0.01$），RAW264.7 组次之（$P < 0.01$），而 caMphi 组几乎没有发现透膜细胞（图 4），说明 aaMphi 和 RAW264.7 细胞能够促进 LLC 细胞侵袭，而 caMphi 则抑制其侵袭。



A：空白对照组；B：caMphi 组；C：aaMphi 组；D：RAW264.7 组

图4 不同活化表型的巨噬细胞对 LLC 细胞侵袭能力的影响 （HE×200）

3 讨论

caMphi 又称为 M1 巨噬细胞。产生 caMphi 需要两个信号：IFN-γ 和外源性 TNF 或内源性的 TNF 诱导剂。caMphi 是通常意义上起正向作用的效应细胞，可以杀伤病原体和肿瘤细胞。表达 iNOS 是 caMphi 最重要的特征和标识。aaMphi 又称为 M2 巨噬细胞。产生 aaMphi 不需要双信号，但需要有合适的诱导剂如IL-4、IL-13 和糖皮质激素等。aaMphi 的功能主要是[1]：①能诱导产生精氨酸酶 1（arginase 1，Arg-1），使得巨噬细胞甘露糖受体（macrophage mannose receptor，MMR）和清道夫受体表达上调，而产生 NO 的能力下降，因此杀伤病原体的能力下降，但是清除机体残留物质的能力较强。②能分泌纤维连接蛋白和基质相关蛋白 βIG-H3，加之 Arg-1 能诱导聚胺和脯氨酸生成，因而能促进血管生成、胶原及纤维形成和细胞外基质沉积。③虽然能上调MHC Ⅱ分子的表达，但并不能有效地递呈抗原，因而主要是抑制 T 细胞增殖。在不同的组织中，Arg-1、MMR、AMAC-1、MGL、Fizz1 和 Ym 等均可以作为 aaMphi 的标识。

TAM 是肿瘤间质中数量最多的炎症细胞群。研究表明，它们参与了肿瘤发生、生长、侵袭和转移的过程，尤其是与肿瘤血管生成和淋巴管生成密切相关[3]。在肺癌中，虽然有研究者认为间质 TAM 不能作为独立的预后因子[4]，但是更多的研究则持相反的观点。Chen 等[5]通过检测人肺癌标本观察到，TAM 数量和微血管密度呈正相关，与无复发生存期呈负相关；将人巨噬细胞和肺癌细胞株共培养发现，后者的侵袭能力和降解基质的活性明显增加，IL-8、MMP-9、VEGF、VEGF-C 和 MMP-1 等基因表达明显上调。但是迄今为止，尚少见有关 aaMphi 与肺癌关系的报道，TAM 的活化表型也未得以明确。虽然 Sica 等[6]曾指出，TAM 可能发生替代性活化，呈现出 aaMphi 的表型，但此观点只是停留在“假说”的层面，尚未得到相应实验的充分证明。

我们首先建立了不同活化表型的巨噬细胞模型，进而发现 aaMphi 能够促进 LLC 细胞的增殖和侵袭，而 caMphi 则抑制其增殖和侵袭，前者与 aaMphi 上调 LLC 细胞表达 VEGF-C 有关，后者与 caMphi 大量分泌 NO 相关。此结果不仅首次在亚群水平明确了活化的巨噬细胞与 LLC 细胞的关系，而且提示肺腺癌间质 TAM 的活化表型可能主要是替代性活化，或者说，在这些 TAM 中，aaMphi 在数量和功能上占据优势，因而呈现出促进肿瘤增殖和侵袭的功能。此外，我们还发现未经任何外源性处理的 RAW264.7 细胞在与 LLC 细胞共培养后，也表现出了与 aaMphi 相似的功能特点。这不仅再次证实了 Chen 等[5]的研究结果，而且与 Hagemann 等[7]的研究结果有相似之处。并再次提示肺腺癌间质 TAM 可能就是一种 aaMphi。

鉴于 aaMphi 在肺腺癌中可能具有的重要作用，它有望成为一个崭新的肿瘤治疗靶点[8]：通过消除肿瘤微环境中存在的诱导产生 aaMphi 的因素或者通过外源性因素逆转 aaMphi 的活化表型，可能恢复巨噬细胞的免疫活性和细胞毒作用，从而达到抑制肿瘤进展和转移的目的。然而，TAM 是否就是 aaMphi，TAM 的表型变化是如何调控的以及 TAM 如何发挥促进肿瘤进展和转移的作用等问题目前仍未解决。有关 TAM 的活化表型问题及其在肺腺癌中的作用，我们正在进行进一步的研究。

参考文献：

[1] Mosser D M. The many faces of macrophage activation[J]. J Leukoc Biol, 2003, 73(2): 209-212.

[2] Edwards J P, Zhang X, Frauwirth K A, *et al*. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations[J]. J Leukoc Biol, 2006, 80(6): 1298-1307.

[3] Lewis C E, Pollard J W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments[J]. Cancer Res, 2006, 66(2): 605-612.

[4] Ogawa E, Takenaka K, Yanagihara K, *et al*. Clinical significance of VEGF-C status in tumour cells and stromal macrophages in non-small cell lung cancer patients[J]. Br J Cancer, 2004, 91(3): 498-503.

[5] Chen J J, Lin Y C, Yao P L, *et al*. Tumor-associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(5): 953-964.

[6] Sica A, Schioppa T, Mantovani A, *et al*. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy[J]. Eur J Cancer, 2006, 42(6): 717-727.

[7] Hagemann T, Wilson J, Burke F, *et al*. Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype[J]. J Immunol, 2006, 176(8): 5023-5032.

[8] Colombo M P, Mantovani A. Targeting myelomonocytic cells to revert inflammation-dependent cancer promotion[J]. Cancer Res, 2005, 65(20): 9113-9116.

（编辑 王 红）