

· 论 著 ·

口腔癌组织中缺氧微环境对单核/巨噬细胞分泌 VEGF 影响的实验研究*

冯红超, 彭江帆, 马 洪, 宋宇峰[△]

(贵阳医学院口腔医学系口腔颌面外科教研室, 贵阳 550004)

摘要:目的 通过缺氧微环境对单核/巨噬细胞分泌血管内皮生长因子(VEGF)影响的实验研究,探讨口腔癌组织局部微环境对单核/巨噬细胞功能的影响。方法 从健康人的外周血中分离单个核细胞并通过培养将其转化为单核/巨噬细胞;分别在缺氧($O_2 < 1\%$)和常氧条件($20\% O_2$)下加入口腔鳞癌细胞系 Tca8113 培养上清液进行单核/巨噬细胞培养,在 3、5、7 h 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测培养上清液中 VEGF 的表达。结果 在缺氧微环境下,单核/巨噬细胞分泌 VEGF 的能力较常氧环境下增加,并随时间的延长而增加($P < 0.05$)。结论 在缺氧的微环境下,单核/巨噬细胞可能更多的通过生长因子的分泌参与肿瘤的生长,但单核/巨噬细胞在肿瘤组织中的作用其具体机制及在肿瘤免疫治疗中的意义还需进一步的研究。

关键词:单核/巨噬细胞;口腔癌;缺氧;血管内皮生长因子

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.17.002

中图分类号:R739.85;R73-3

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)17-2244-02

Experimental study on secretion of VEGF of monocytes/macrophages in hypoxic microenvironment in oral cancer*

FENG Hong-chao, PENG Jian-fan, MA Hong, et al.

(Department of Stomatology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

Abstract: Objective To investigate the secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF) of monocytes/macrophages in hypoxic microenvironment of oral cancer in vitro. **Methods** Peripheral blood mononuclear cells were extracted from healthy person's blood and cultivated to transform into monocytes/macrophages. Then monocytes/macrophages were cultured in hypoxic microenvironment ($O_2 < 1\%$) and in normal microenvironment ($20\% O_2$). The expression of VEGF was detected by enzyme-link immunoassay (ELISA). **Results** The expression of VEGF excreted by mononuclear/macrophage was significantly higher in hypoxic microenvironment than in normal microenvironment. **Conclusion** In hypoxic microenvironment, the secretion of VEGF by mononuclear/macrophage is gradually increased. But the mechanism of monocytes/macrophages' function in tumor needs more research.

Key words: monocytes/macrophages; carcinoma; hypoxia; VEGF

肿瘤内浸润的单核/巨噬细胞被称为肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophage, TAM),其功能状态的研究对肿瘤的免疫治疗具有重要的意义。由于单核/巨噬细胞不同的表型特征和活化特性与所处的局部微环境有关,而肿瘤组织内局部多处于缺氧状态,本文通过细胞培养的方法进行研究,探讨口腔癌中缺氧的微环境对单核/巨噬细胞功能影响,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 试剂 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购于上海西唐生物科技有限公司;双抗、淋巴细胞分离液、单核细胞分离液,购于天津市灏阳生物制品科技有限责任公司;抗 CD68 单克隆抗体、无钙镁 PBS 液购于武汉博士德生物工程有限公司;RPMI-1640 培养液购于美国 Gibco 公司;胎牛血清购于杭州四季青生物工程材料有限公司。

1.2 细胞 Tca-8113 人舌鳞癌细胞株,购自中国科学院细胞库/中国科学院上海生命科学研究所以细胞资源中心。

1.3 单核/巨噬细胞的培养及获取 采用密度梯度离心法后通过两次贴壁法,获得有大量单个核细胞贴壁的培养板,然后在培养板中加入 RPMI-1640(含 10% 胎牛血清、1% 双抗)在 37℃、5% CO_2 培养箱中继续培养,每隔 3 d 换液,到第 7 天时采用机械法收获贴壁的单核/巨噬细胞。用倒置显微镜观察,可见单核/巨噬细胞贴壁细胞逐渐变大,且胞体拉长,呈梭形或多角形,具备典型的单核/巨噬细胞形态。

1.4 流式细胞仪进行鉴定 用抗 CD68 单克隆抗体分析悬液中的细胞,单核/巨噬细胞定义为 CD68 阳性细胞,结果 CD68 阳性细胞占 94.03%,满足实验需要。以瑞氏染色计数单核/巨噬细胞数目,胎盘蓝染色计数死细胞,中性红计数活细胞,结果细胞活性大于 96%。

1.5 细胞培养方法及检测 将 Tca-8113 培养上清液(每孔 0.3 mL)、巨噬细胞(每孔 0.3 mL)加入 12 孔板中,缺氧组放入密闭的厌氧罐中(37℃、 $O_2 < 1\%$),常氧组在 37℃、20% O_2 、5% CO_2 条件下培养,分别在 3、5、7 h 收集培养上清液,后采用人 VEGF ELISA 试剂盒进行检测,操作步骤严格按照说明书

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30660200);贵州省优秀科技教育人才省长专项基金资助项目(2005)160 号。 [△] 通讯作者, E-mail: hongchaof@yahoo.com.cn。

进行,每组设 5 个复孔。

1.6 统计学处理 应用 SPSS10.0 统计软件分析,采用配对 t 检验及方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

缺氧微环境对单核/巨噬细胞分泌 VEGF 的影响(图 1)。在缺氧组培养 5 h 后,培养液中的 VEGF 显著增高,7 h 达到最高,在 3、5、7 h,VEGF 分泌量均高于同一时间内的常氧培养条件下的分泌量,差异有统计学意义($P < 0.01$),这说明缺氧条件下增加了单核/巨噬细胞分泌 VEGF 的能力。

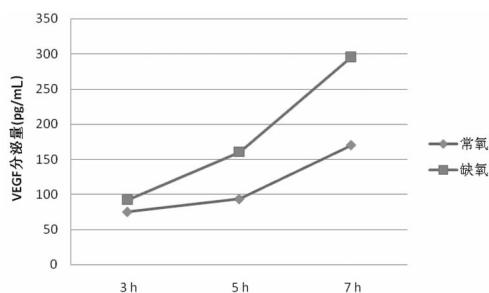


图 1 缺氧微环境对单核/巨噬细胞分泌 VEGF 的影响

3 讨论

本研究显示,在缺氧环境下单核/巨噬细胞分泌 VEGF 的能力增加。

肿瘤细胞必须依赖于宿主的支持才能够形成肿瘤,包括各种组织细胞、炎细胞、淋巴管、维持肿瘤生长和作为日后远处转移途径的血管等,其共同构成了肿瘤发生、发展的微环境^[1]。有研究表明,巨噬细胞是肿瘤间质中细胞数量最多的一种^[2]。单核/巨噬细胞具有广泛生物学活性和高度复杂多变的表型,在肿瘤组织中,作为正向调控的效应细胞,其介导直接的抗肿瘤细胞毒性或参与肿瘤相关抗原的提呈,以利于肿瘤的清除;另一方面,在肿瘤细胞组织内单核/巨噬细胞可分化形成具有独特表型的巨噬细胞,这些巨噬细胞可促进肿瘤细胞的增殖及抑制 T 细胞和自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)的抗肿瘤活性^[3-4]。单核/巨噬细胞的功能取决于所处的微环境^[5],针对不同的微环境信号行使不同的功能是巨噬细胞的生物学特征。而在实体肿瘤形成过程中,肿瘤生长迅速,随着肿瘤体积的增大,肿瘤内部不能得到足够的血液供应,导致供氧和耗氧的不平衡,许多研究发现肿瘤内部都存在一定程度或一定区域的缺氧,缺氧是大多数实体瘤的特征之一。本课题组的前期研究显示,在口腔鳞癌组织内有大量的巨噬细胞浸润,进一步研究发现口腔癌组织内可以分泌对单核/巨噬细胞有趋化作用的血管细胞黏附分子-1^[6],从而促使单核/巨噬细胞在口腔癌中的浸润和聚集。近年来越来越多的证据表明肿瘤组织中的单核/巨噬细胞通过多种途径参与了肿瘤的生长和转移^[7-8],本课题组在口腔癌的研究中发现单核/巨噬细胞可以分泌促肿瘤血管生成作用最强的因子之一 VEGF^[9],而 VEGF 在口腔癌生长和侵袭转移中起重要作用^[10]。口腔癌及其他肿瘤的研究中表明肿瘤组织中浸润的单核/巨噬细胞多聚集在微血管较少的缺氧区域^[11-12]。因此本研究推测可能由于局部缺氧的微环境是促使

单核/巨噬细胞的功能发生了改变,而本研究进一步证实局部缺氧的微环境下,单核/巨噬细胞分泌 VEGF 的能力增加,从而更多地参与了肿瘤的生长和转移。

总之,本研究表明在缺氧的微环境下,单核/巨噬细胞可能通过分泌功能更多的参与了肿瘤的生长,但由于单核/巨噬细胞又具有复杂表型和活化状态,因此其在肿瘤中的具体机制及如何调节其功能均需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] Villanueva J, Herlyn M. Melanoma and the tumor micro-environment[J]. *Curr Oncol Rep*, 2008, 10(5):439.
- [2] Collingridge DR, Hill SA, Chaplin DJ. Proportion of infiltrating IgG-binding immune cells predict for tumor hypoxia[J]. *Br J Cancer*, 2001, 84(5):626.
- [3] Elgert KD, Alleva DG, Mullins DW. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection[J]. *J Leukoc Biol*, 1998, 64(3):275.
- [4] Pollard JW. Tumor-educated macrophages promote tumour progression and metastasis[J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(1):71.
- [5] Gordon S. Alternative activation of macrophages[J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(1):23.
- [6] 孙乐刚,刘玲,冯红超,等. 血管细胞黏附分子-1 在口腔鳞状细胞癌中的表达及其与血管生成的关系[J]. *现代口腔医学杂志*, 2007, 21(3):267.
- [7] Yuan A, Chen JJ, Yang PC. Pathophysiology of tumor-associated macrophages[J]. *Adv Clin Chem*, 2008, 45:199.
- [8] Allavena P, Sica A, Solinas G, et al. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2008, 66(1):1.
- [9] 冯红超,宋宇峰,温玉明. 口腔鳞癌中 VEGF 表达和肿瘤相关巨噬细胞在血管生成作用中相互作用的初步研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2004, 31(8):435.
- [10] 金晓明,李雅馨,刘桂芳,等. 血管内皮生长因子对口腔鳞状细胞癌细胞侵袭能力的影响[J]. *现代口腔医学杂志*, 2005, 19(1):67.
- [11] 冯红超,宋宇峰. 口腔鳞癌巨噬细胞和微血管的空间关系[J]. *贵阳医学院学报*, 2003, 23(2):12.
- [12] Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues[J]. *Blood*, 2004, 104(8):2224.

(收稿日期:2009-11-25 修回日期:2010-02-14)