

THP-1来源的M1型巨噬细胞对食管鳞癌细胞的 凋亡、增殖与迁移作用

杨银银¹, 李惠武², 刘玲¹, 朱世茂¹, 海妮萨依姆·图尔荪¹, 李卉^{3*}

(¹新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830011; ²粤北人民医院医学研究中心, 韶关 512025;

³新疆医科大学中心实验室, 乌鲁木齐 830011)

摘要: THP-1细胞经LPS和IFN- γ 活化诱导为经典激活的M1型巨噬细胞。M1型巨噬细胞在肿瘤发生的初期发挥着重要的作用, 能够识别并清除肿瘤细胞, 但对食管鳞癌细胞Eca109的具体调节作用尚不清楚。本研究利用THP-1细胞来源的M1型巨噬细胞与食管鳞癌细胞Eca109共培养模型; 用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测*TNF- α* 和*IL-1 β* mRNA的表达; 用流式细胞技术、Transwell实验检测M1型巨噬细胞与食管鳞癌细胞Eca109共培养24 h后对Eca109细胞凋亡、增殖与迁移的影响。结果显示, 诱导后的THP-1细胞完全贴壁并有伪足出现; 与M0细胞相比, 诱导的M1型巨噬细胞相关细胞因子*TNF- α* 、*IL-1 β* 的mRNA表达均显著增高($P < 0.01$); 与M1型巨噬细胞共培养后可以促进食管鳞癌细胞的凋亡($P < 0.01$)、抑制食管鳞癌细胞的增殖($P < 0.01$)与迁移($P < 0.001$)。本研究结果提示, THP-1来源的M1型巨噬细胞与食管鳞癌细胞Eca109共培养可以促进食管鳞癌细胞Eca109的凋亡, 抑制其增殖与迁移。

关键词: THP-1; M1型巨噬细胞; 食管鳞癌细胞Eca109; 共培养

Effects of THP-1-derived M1 macrophages on apoptosis, proliferation and migration of esophageal squamous cell carcinoma cells

YANG Yinyin¹, LI Huiwu², LIU Ling¹, ZHU Shimao¹, HAINISAYIMU Tuersun¹, LI Hui^{3*}

(¹School of Basic Medical Sciences, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;

²Medcal Research Center of Yuebei People's Hospital, Shaoguan 512025, China;

³Central Laboratory of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

Abstract: THP-1 cells are induced into classic activated M1 macrophages by LPS and IFN- γ activation. M1 macrophages play an important role in the early stage of tumorigenesis. M1 macrophages can recognize and remove tumor cells, but the specific regulatory effect on esophageal squamous cell carcinoma cell line Eca109 is not clear. In this study, the model of co-culture of M1 macrophages derived from THP-1 cells with esophageal squamous cell carcinoma cell line Eca109 was used, the expression of *TNF- α* and *IL-1 β* was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR), and the effect of M1 macrophage co-cultured with esophageal squamous cell carcinoma cell line Eca109 on apoptosis, proliferation and migration of Eca109 cells were detected by flow cytometry and transwell assay. The results showed that

收稿日期: 2021-11-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(81660459)

第一作者: E-mail: 1595059303@qq.com

*通信作者: E-mail: huihui922@126.com

the induced THP-1 cells adhered to the wall completely and had pseudopodia, and the mRNA expression of *TNF- α* and *IL-1 β* of M1 macrophages was significantly higher than that of M0 cells ($P<0.01$). Co-culture with M1 macrophages could promote apoptosis and inhibit the proliferation and migration of esophageal squamous cell carcinoma cells ($P<0.01$). The results suggest that co-culture of THP-1-derived M1 macrophages with esophageal squamous cell carcinoma cell line Eca109 can promote the apoptosis ($P<0.01$) of esophageal squamous cell carcinoma cell line Eca109 and inhibit its proliferation ($P<0.01$) and migration ($P<0.001$).

Key Words: THP-1; M1 macrophage; esophageal cancer cell Eca109; co-culture

癌症已经成为全球人类第二大死因,据世界卫生组织统计,有近六分之一的死亡是由癌症引发的。食管癌是世界上最普遍的八大恶性肿瘤之一,报道显示,全球食管癌发病率和死亡率分别居第8位和第6位^[1]。

巨噬细胞是肿瘤间质中最大的白细胞群之一,在肿瘤的进展中起着极其重要的作用。这些巨噬细胞也被称为肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)^[2]。TAMs在调节肿瘤生长、侵袭和转移等方面发挥着极其重要的作用,约占肿瘤体积的一半^[3]。TAMs可以通过多种机制促进肿瘤细胞的生长,肿瘤的生长主要取决于基质、浸润的炎性细胞等肿瘤微环境的变化。巨噬细胞是一种异质的具有可塑性的细胞群,通过整合来自外界周围环境中的变化信号,可以被激活为两种不同的亚型——M1极化表型(促炎和免疫刺激)和M2极化表型(抗炎和免疫抑制髓细胞)^[4];在癌症的早期阶段以促炎激活的M1型巨噬细胞为主。本研究以THP-1来源的M1巨噬细胞对食管鳞癌细胞Eca109生物学行为的影响为主线,探讨在炎症早期阶段M1型巨噬细胞对食管鳞癌细胞Eca109的调节作用。

1 材料与方法

1.1 研究材料

THP-1(proc cell CL-0233)细胞株由武汉普诺赛生命科技有限公司提供。佛波酯(PMA)、脂多糖(LPS)、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)均购自Sigma公司。IFN- γ 购自R&D SYSTEMS公司。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、RPMI1640培养基、PBS缓冲液、0.25%胰蛋白酶消化液、青链霉素混合液均购自Biological Industry公司。一步法

RT-PCR检测试剂盒购自TaKaRa公司。Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自BD公司。Trizol试剂购自Prima公司。1%结晶紫染色液购自北京索莱宝科技有限公司。细胞周期检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司。Transwell细胞培养板购自Costar公司。7500型荧光定量PCR仪购自ABI公司。

1.2 细胞培养

THP-1细胞为悬浮生长细胞,生长速度比较快,在含有10%胎牛血清、1%青链霉素的RPMI1640培养基中培养,细胞密度最低控制在 $3\times 10^5/\text{mL}$,达到 $8\times 10^5/\text{mL}$ 时传代。复苏后每48 h加入一定体积的完全培养基进行传代,直至达到上述最大密度之后,每隔2 d传代一次至完全更换培养液。

1.3 PMA和LPS诱导THP-1细胞定向分化为M1型巨噬细胞

取 $5\times 10^5\sim 8\times 10^6$ 个THP-1细胞接种于共培养皿上室。THP-1细胞在含有PMA(100 ng/mL)的10% FBS、不含双抗的培养基中,置于37℃、5% CO_2 孵箱中静置培养16 h后,更换为含10% FBS的RPMI1640培养基,加入终剂量为100 ng/mL的LPS和20 ng/mL的IFN- γ 。培养箱中静置培养18~24 h即诱导分化为M1型巨噬细胞。

1.4 定向诱导分化后的M1型巨噬细胞与Eca109细胞共培养

取对数生长期Eca109细胞以 $5\times 10^5\sim 7\times 10^5$ 的密度均匀接种于六孔板。培养12 h至完全贴壁后,将上室诱导分化好的THP-1-M1型巨噬细胞加入上室,上室加入10% FBS的完全培养基1.5~1.8 mL,下室加入同样的培养基2.0~2.5 mL,共培养24 h。由于两种细胞消耗营养物质较快,间隔12 h进行一

次半数换液。

1.5 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)

Trizol法提取细胞总RNA并测定RNA的浓度和纯度。按照TaKaRa逆转录试剂盒说明书将RNA逆转录为cDNA, 并存放于20℃冰箱保存。由上海生物工程技术有限公司合成所需引物。*IL-1 β* 引物如下, F: 5'-TGG CTT ATT ACA GTG GCA ATG AGG ATG-3'; R: 5'-TGT AGT GGT GGT CGG AGA TTC GTA G-3'。*TNF- α* 引物如下, F: 5'-AGC TGG TGG TGC CAT CAG AGG-3'; R: 5'-TGG TAG GAG ACG GCG ATG CG-3'。 *β -actin*引物如下, F: 5'-GAG CAC AGA GCC TCG TT-3'; R: 5'-GAG CGC GGC GAT ATC ATC A-3'。PCR扩增, 最后进行结果的统计分析。

1.6 细胞凋亡实验

收集正常培养和与诱导的M1型巨噬细胞共培养24 h后的各组Eca109细胞, 胰蛋白酶消化后1 000 r/min离心5 min, 弃上清。用PBS洗涤两次, 调整细胞密度为 1×10^6 个细胞。再次以相同转速离心, 弃上清, 加入1 mL结合缓冲液重悬细胞, 分装到对应的2 mL EP管中, 相应加入膜联蛋白-V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)和碘化丙啶(PI)各5 μ L, 避光孵育15 min后, 过滤网后流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率。其中每组实验均重复三次。

1.7 细胞周期检测

Eca109细胞以 5×10^5 /孔的密度接种于6孔板。培养箱静置培养12 h后, 对照组在共培养皿上室以相同条件诱导M1型巨噬细胞。诱导完成后, 将含有M1型巨噬细胞的小室与含有Eca109细胞的6孔板进行组合, 此时记录为共培养开始的时间。培养箱静置培养24 h后, 弃去上清, 用胰蛋白酶消化正常培养以及共培养的细胞, PBS洗一遍, 1 000 r/min离心5 min, 弃去上清, 加入70%冷乙醇500 μ L固定, 4℃过夜。第2天, 1 000 r/min离心5 min, 弃去固定液, 用PBS洗一遍。过200目筛网到1.5 mL EP管中, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 加入500 μ L PI/PNaseA染色工作液(Rnase: PI按19体积配置)避光40 min。

1.8 Transwell迁移实验

取与THP-1-M1共培养24 h的Eca109细胞与正

常培养24 h的Eca109细胞进行细胞计数器分别计数。计数用不含血清的培养基重悬, 加入24孔板Transwell培养皿上室, 孔径0.8 μ m, 每上室200 μ L细胞悬液含 1×10^4 个细胞, 下室为500 μ L含10% FBS的完全培养基, 置于37℃、5% CO₂孵箱中静置培养18~24 h后, 弃去培养基, 用PBS洗两遍。0.4%多聚甲醛固定30 min后PBS洗两遍, 0.1%结晶紫染色5 min(可回收), PBS洗去结晶紫, 用棉签擦去小室内侧细胞, 置于倒置显微镜下拍照, 使用Image J软件统计穿过小室的细胞数。

1.9 统计学处理

采用GraphPad Prism 8.0.1对实验数据进行统计与分析。计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间均数比较采用 t 检验; 多组间均数比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 THP-1细胞经PMA诱导再经不同细胞因子诱导分化后的形态变化

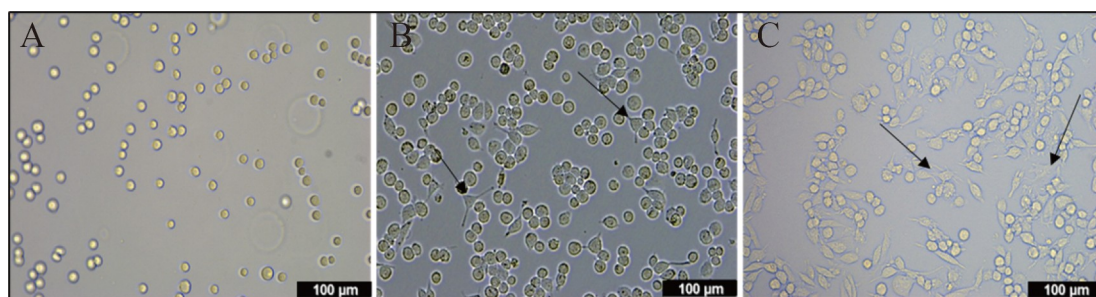
为了观察THP-1细胞诱导过程中的形态变化, 用荧光倒置显微镜对各阶段诱导的THP-1进行拍照处理。结果显示, THP-1细胞形态饱满、折光性好, 为单个悬浮生长细胞, 近似球形(图1A)。当THP-1被PMA刺激24 h后, 细胞全部贴壁, 且有少量伪足出现(图1B箭头所示)。随后加入LPS和IFN- γ 诱导细胞定向分化, 显微镜下观察发现, THP-1-M1细胞有大量触角状出现并呈“荷包蛋”形态(图1C箭头所示)。

2.2 qRT-PCR检测THP-1细胞来源的M1型巨噬细胞*TNF- α* 、*IL-1 β* mRNA的表达情况

为了检测诱导的巨噬细胞是否趋向于M1型, 用qRT-PCR检测M1巨噬细胞的典型标志物*TNF- α* 、*IL-1 β* mRNA的表达(图2)。结果显示, 与M0相比, 诱导的M1型巨噬细胞中*TNF- α* ($P < 0.01$)和*IL-1 β* ($P < 0.001$)的mRNA表达均明显增高。

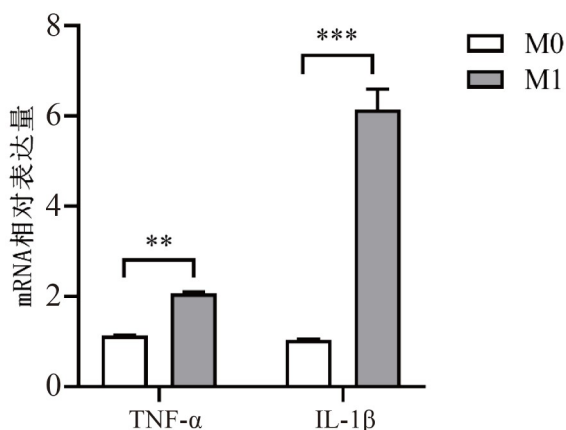
2.3 THP-1-M1型巨噬细胞从形态上观察促进食管鳞癌细胞凋亡

为了观察与M1型巨噬细胞共培养对Eca109细胞的外观形态的改变, 做了与M1巨噬细胞共培养24 h后(图3A), 对Eca109用4%多聚甲醛固定30 min, 0.1%结晶紫染色后荧光倒置显微镜下拍



A: THP-1; B: PMA刺激后的THP-1; C: LPS联合IFN- γ 刺激后的THP-1

图1 不同细胞因子刺激后THP-1细胞的形态变化图



TNF- α 、IL-1 β 的mRNA表达结果。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图2 qRT-PCR对M1型巨噬细胞的鉴定

照。结果显示,正常Eca109细胞形态规则呈梭形;与M1巨噬细胞共培养的Eca109细胞形态不规则,发生明显皱缩,且与正常组细胞相比染色加深(图3B和图3C)。

2.4 与THP-1-M1型巨噬细胞共培养促进Eca109细胞的凋亡

为了研究与M1型巨噬细胞共培养后对Eca109细胞凋亡的影响,用流式细胞仪检测Eca109细胞

与THP-1来源的M1型巨噬细胞共培养24 h的凋亡率。结果显示,与M1型巨噬细胞共培养24 h能促进Eca109细胞的凋亡($P < 0.01$)(图4)。

2.5 与THP-1-M1型巨噬细胞共培养抑制食管癌细胞的增殖

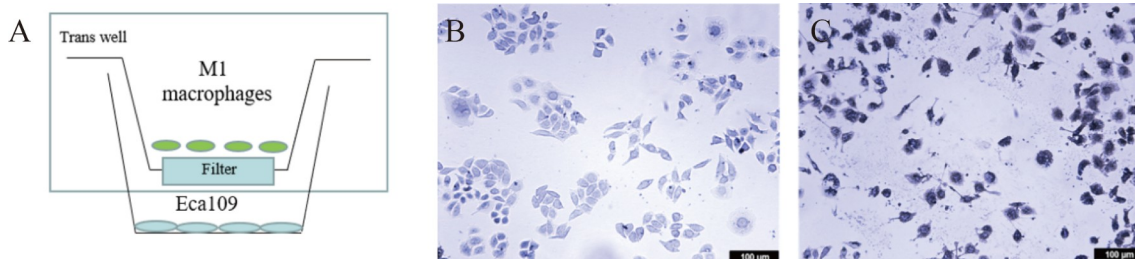
为了研究与M1型巨噬细胞共培养后对Eca109细胞增殖的影响,用流式细胞仪检测与THP-1来源的M1型巨噬细胞共培养24 h的细胞周期变化。结果显示,与THP-1-M1型巨噬细胞共培养24 h, Eca109细胞S期受到明显抑制($P < 0.01$), S期为DNA复制合成期。结果提示,与THP-1来源的M1型巨噬细胞共培养能够抑制食管癌细胞的增殖(图5)。

2.6 与THP-1-M1型巨噬细胞共培养抑制食管癌细胞的迁移

为了研究与M1型巨噬细胞共培养后对Eca109细胞运动能力的影响,我们做了Transwell迁移实验。结果显示,与THP-1-M1共培养24 h时的细胞穿孔数目明显比正常组少($P < 0.001$)(图6)。

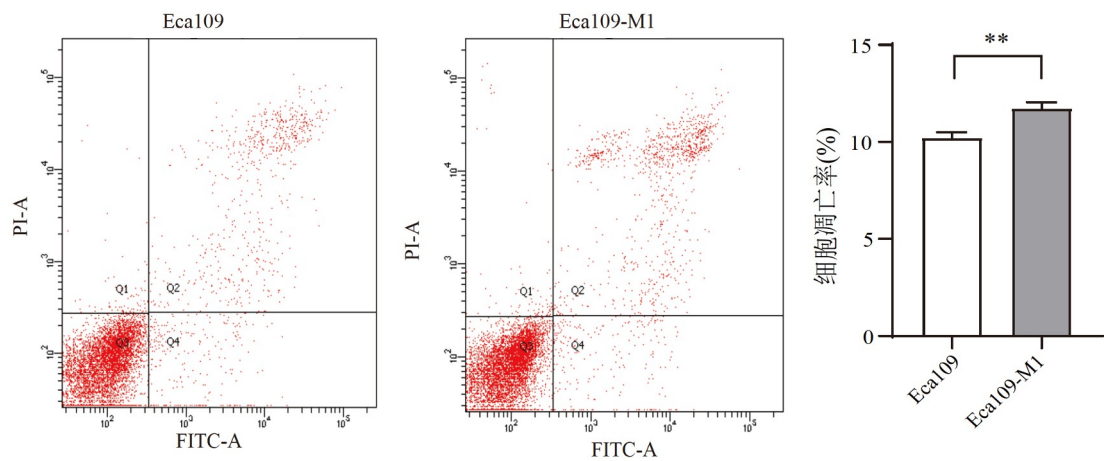
3 讨论

食管癌是常见的消化道肿瘤,它依据病理分



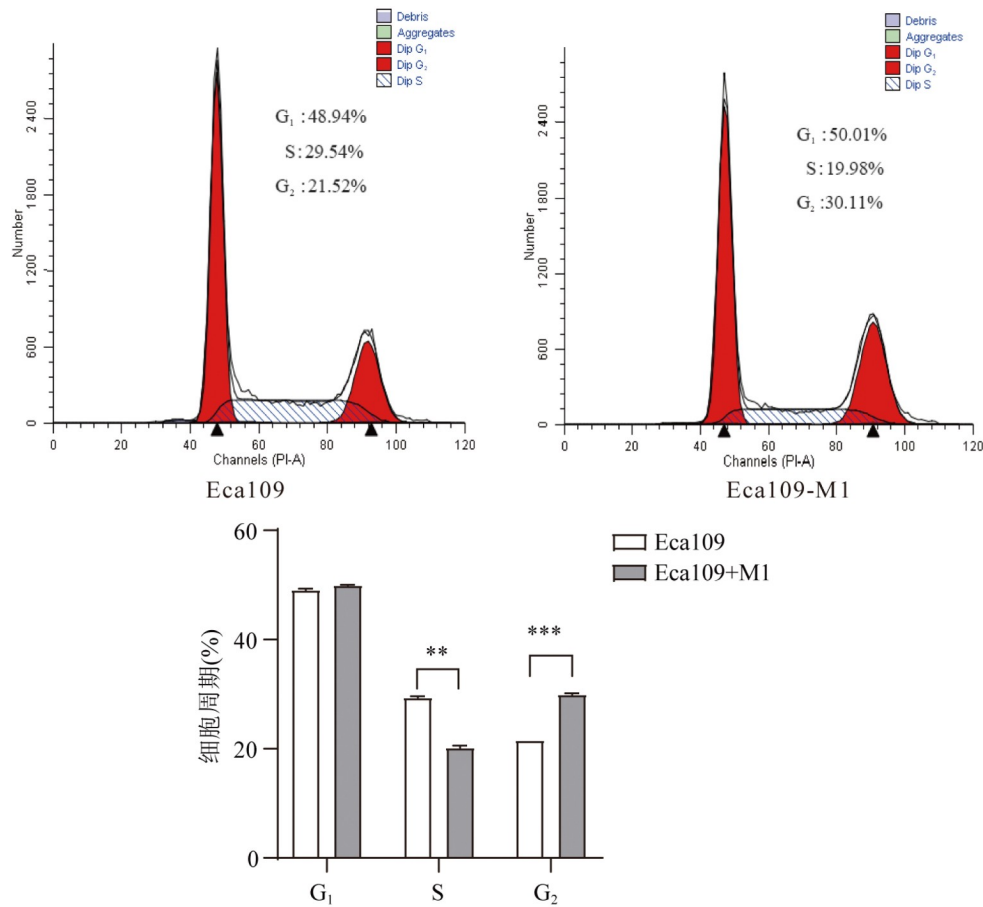
A: 共培养模型图; B: 正常Eca109细胞形态; C: 与THP-1-M1共培养的Eca109细胞形态

图3 与M1型巨噬细胞共培养24 h后Eca109形态变化图



** $P < 0.01$

图4 THP-1-M1型巨噬细胞对Eca109细胞凋亡的影响

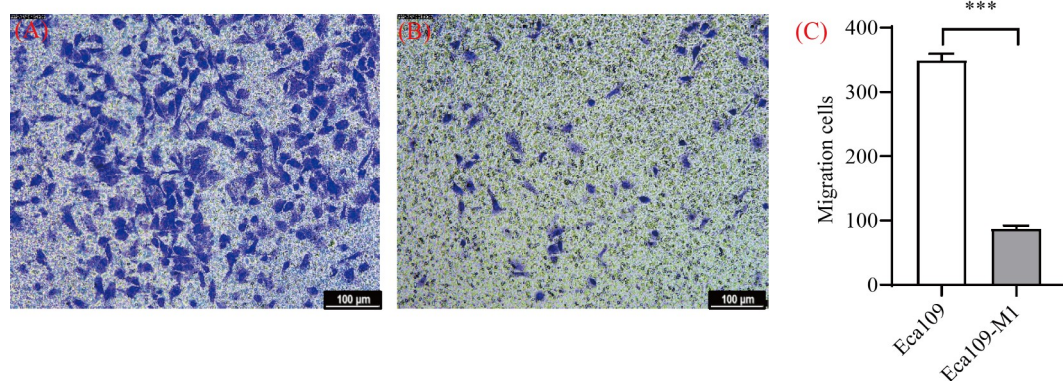


** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图5 THP-1-M1型巨噬细胞对Eca109细胞增殖的影响

型, 主要分为食管腺癌和食管鳞癌两大类, 以食管鳞癌最为常见。食管癌的发生与许多因素有关。据数据分析显示, 在SDI水平低的国家, 30%的癌症发生与慢性炎症有关^[5]。慢性炎症参与免疫

抑制, 从而为肿瘤的发生、发展和转移提供了有利的微环境。慢性炎症部位主要浸润的免疫细胞是巨噬细胞和淋巴细胞^[6]。巨噬细胞是一类异质性的可塑性细胞群^[7], TAMs与肿瘤的发生发展密切



A: Eca109细胞迁移情况; B: 与THP-1-M1共培养的Eca109细胞的迁移情况; C: 细胞迁移情况的统计分析, *** $P<0.001$

图6 THP-1-M1型巨噬细胞对Eca109细胞迁移的影响

相关^[8], 通过非免疫和免疫机制在促进肿瘤发生和转移中发挥着关键作用, 导致各种类型实体肿瘤和血液恶性肿瘤患者的临床预后较差^[9,10]。

THP-1细胞系具有与人单核细胞相似的形态和功能, 且具有稳定的基因背景, 因此是外周血单核细胞合适的替代, 广泛用于单核巨噬细胞模型, 是研究免疫和炎症的理想工具^[11]。关于巨噬细胞的诱导分化, 诱导浓度和诱导时间其文献报道不一, 鉴定的方法也不尽相同^[12]。本研究鉴于肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)是M1型巨噬细胞的典型标志物^[13], 也是介导各种炎症反应的关键因子, 采用实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)评估这些基因的表达, 由此验证诱导的巨噬细胞趋向于M1型。在肿瘤微环境中存在两种不同的分化类型: 经典活化的M1型巨噬细胞和替代性活化的M2型巨噬细胞^[14], TAM的极化是一个动态过程, 根据肿瘤类型和肿瘤分期^[15]显示出不同功能和表型多样性。尽管TAMs通常被认为可以与M2型巨噬细胞互换, 但由于其独特的转录和表型特征, TAMs被认为是一个单独的亲肿瘤巨噬细胞组^[16]。常规的巨噬细胞M1-M2二分法有助于理解巨噬细胞的极化, 但过于简单, 没有考虑可能影响TAM功能的各种因素, 包括肿瘤的位置、类型和分期。基于一组特定的标记来识别具有重叠特征的TAMs特定亚群一直是一个挑战。此外, 在TAMs中观察到的异质性是否源于肿瘤发展过程中不同的前体或微环境刺激的变化仍有待研究^[3]。

为了模拟癌细胞与M1型巨噬细胞之间的通讯, 将M1型巨噬细胞与食管鳞癌细胞Eca109共培

养, 利用间接接触的方法, 探讨巨噬细胞通过分泌细胞因子对食管鳞癌细胞Eca109的调节作用。巨噬细胞在促炎因子刺激下, 可释放一系列炎症因子, 这些炎症因子又进一步促进巨噬细胞的招募与M1型细胞的极化。巨噬细胞是怎样进行极化的? 有研究表明, JAK-STAT信号通路与巨噬细胞分化关系紧密^[17,18]。炎症因子种类复杂多样, 可激活相应的JAK-STAT通路, 发挥信号转导与转录激活的功能, 从而调控巨噬细胞的M1/M2型极化和炎症走向。除此之外, 还有研究表明, JAK-STAT通路与Toll样受体相互作用, 共同调控巨噬细胞极化与炎症反应^[19]。基于此, JAK-STAT信号通路在炎症相关疾病中应用前景较好, 可做进一步的深入研究以及相关药物的研发。

细胞凋亡是生物基本生理过程, 是指为维持内环境稳定由基因控制的细胞自主有序的死亡^[20], 细胞的凋亡、迁移运动在机体免疫、损伤、修复等生理过程以及炎症、癌症转移等病理过程中都起着重要作用。Transwell与周期实验结果表明, 与巨噬细胞共培养24 h能抑制细胞增殖与迁移; 但随着共培养时间的不断延长, 受肿瘤微环境的影响将表现出对肿瘤细胞怎样的调节趋势? 综合上述结果提示: M1型巨噬细胞与食管鳞癌细胞共培养24 h表现为促进食管鳞癌细胞凋亡, 抑制其增殖与迁移能力, 但随着共培养时间的延长, 受肿瘤微环境的影响, M1型巨噬细胞是否会逐渐向M2型极化, 表现为促肿瘤增殖与迁移的作用? 这有待进一步的研究。因此, 针对肿瘤相关巨噬细胞的靶向治疗有可能成为食管癌治疗的新途径。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424
- [2] 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. *Mol Cancer*, 2019, 18(1): 64
- [3] Zhao C, Pang X, Yang Z, et al. Nanomaterials targeting tumor associated macrophages for cancer immunotherapy. *J Control Release*, 2022, 341: 272-284
- [4] 王莉新, 吴文斌, 胥孜杭, 等. 黄芪甲苷通过诱导M1型巨噬细胞极化发挥抗肿瘤作用的机制. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(14): 19-24
- [5] You L, Lv Z, Li C, et al. Worldwide cancer statistics of adolescents and young adults in 2019: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. *ESMO Open*, 2021, 6(5): 100255
- [6] Panasco MS, Pelajo-Machado M, Lenzi HL. Omental and pleural milky spots: different reactivity patterns in mice infected with *Schistosoma mansoni* reveals coelomic compartmentalisation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2010, 105(4): 440-444
- [7] Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas. *J Clin Invest*, 2012, 122(3): 787-795
- [8] Mantovani A, Allavena P. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. *J Exp Med*, 2015, 212(4): 435-445
- [9] Petty AJ, Yang Y. Tumor-associated macrophages: implications in cancer immunotherapy. *Immunotherapy*, 2017, 9(3): 289-302
- [10] Petty AJ, Yang YP. Tumor-associated macrophages in hematologic malignancies: new insights and targeted therapies. *Cells*, 2019, 8(12): 1256
- [11] Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: an *in vitro* cell model for immune modulation approach. *Int ImmunoPharmacol*, 2014, 23(1): 37-45
- [12] Genin M, Clement F, Fattaccioli A, et al. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*, 2015, 15(1): 577
- [13] 管新竹, 王怡茹, 张一凡, 等. ERK5对M1型巨噬细胞标志炎症因子iNOS、MCP-1表达的影响. *暨南大学学报(自然科学与医学版)*, 2020, 41(1): 10-15
- [14] Burkert J, Otto WR, Wright NA. Side populations of gastrointestinal cancers are not enriched in stem cells. *J Pathol*, 2008, 214(5): 564-573
- [15] Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, 2010, 141(1): 39-51
- [16] Biswas SK, Gangi L, Paul S, et al. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF- κ B and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood*, 2006, 107(5): 2112-2122
- [17] 赵九洲, 姜晓旭, 李宏伟, 等. JAK-STAT信号通路 with 巨噬细胞炎症调控的研究进展. *癌变·畸变·突变*, 2020, 32(5): 402-404, 408
- [18] Yeganegi M, Leung CG, Martins A, et al. Lactobacillus rhamnosus GR-1-induced IL-10 production in human placental trophoblast cells involves activation of JAK/STAT and MAPK pathways. *Reprod Sci*, 2010, 17(11): 1043-1051
- [19] Hu X, Chen J, Wang L, et al. Crosstalk among Jak-STAT, toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation. *J Leukocyte Biol*, 2007, 82(2): 237-243
- [20] Yang Q, Fei Z, Huang C. Betulin terpenoid targets OVCAR-3 human ovarian carcinoma cells by inducing mitochondrial mediated apoptosis, G₂/M phase cell cycle arrest, inhibition of cell migration and invasion and modulating mTOR/PI3K/AKT signalling pathway. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2021, 67(2): 14-19