

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 32720131150552

UDC \_\_\_\_\_

# 厦 门 大 学

## 硕 士 学 位 论 文

### 新型二氧化锰纳米粒子诱导肿瘤相关巨噬细胞表型变化及改善肿瘤乏氧以增强化疗疗效的研究

**Novel Manganese Dioxide Nanoparticles Enhance Chemotherapy Response by Priming Tumor-Associated Macrophages toward M1-like Phenotype and Attenuating Tumor Hypoxia**

宋曼莉

指导教师姓名: 张现忠 教授

专业名称: 流行病学与卫生统计学

论文提交日期: 2016年4月

论文答辩时间: 2016年5月

学位授予日期: 2016年 月

答辩委员会主席: 苏新辉

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2016年 5月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（厦门大学影像暨转化医学研究中心·张琨忠）课题（组）的研究成果，获得（国家重点基础研究计划（973计划））经费或实验室的资助，在（厦门大学影像暨转化医学研究中心）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：宋曼莉

2016年5月23日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

- (        ) 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于     年    月    日解密，解密后适用上述授权。
- (  ) 2. 不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人（签名）： 宋曼莉

2016年5月23日

## 摘要

缺血缺氧是肿瘤微环境的重要特征之一，肿瘤的缺血缺氧不仅促进了肿瘤细胞的侵袭转移，同时还增强肿瘤对化疗药物的耐药性。肿瘤相关巨噬细胞（Tumor-associated macrophages, TAMs）浸润在肿瘤微环境之中，通常在肿瘤缺血缺氧区域富集。肿瘤相关巨噬细胞作为肿瘤微环境的重要功能细胞，其在肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移、化疗耐药等肿瘤进展的各个阶段均发挥着重要作用。鉴于此，我们提出一种新型的肿瘤治疗策略，以期改变肿瘤微环境的同时，增强实体瘤对化学治疗的疗效。我们利用肿瘤相关巨噬细胞在肿瘤缺血缺氧区域富集的特点，设计合成多功能甘露糖-透明质酸-二氧化锰纳米粒子（Man-HA-MnO<sub>2</sub> NPs），其通过靶向肿瘤相关巨噬细胞，将 Man-HA-MnO<sub>2</sub> 纳米粒子靶向递送到肿瘤缺血缺氧区域，利用 Man-HA-MnO<sub>2</sub> 纳米粒子与双氧水（Hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）高效响应生成氧气（O<sub>2</sub>）和调节肿瘤微环境 pH 值的能力，显著改善肿瘤缺氧和酸性微环境。另外，我们发现在 MnO<sub>2</sub> 纳米粒子上修饰的透明质酸（HA），具有诱导肿瘤相关巨噬细胞表型转化的功能，HA 可以诱导肿瘤相关巨噬细胞表型由抑制炎症辅助肿瘤恶化的 M2 型巨噬细胞转化为具有致炎和肿瘤杀伤抑制功能的 M1 型巨噬细胞。表型转化后的 M1 型巨噬细胞释放出大量 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，不仅对肿瘤有杀伤作用，而且在肿瘤缺血缺氧的酸性环境下与 Man-HA-MnO<sub>2</sub> 纳米粒子快速响应释放出大量 O<sub>2</sub>，有效缓解肿瘤的缺氧状态，同时消耗 H<sup>+</sup>，改善肿瘤组织的酸性微环境。结果显示通过改善肿瘤的微环境，肿瘤缺氧诱导因子-1 $\alpha$ （HIF-1 $\alpha$ ）和血管内皮生长因子（VEGF）表达下调，肿瘤的生长和发展被有效抑制。并且这种肿瘤给氧治疗的方法还可以显著提高肿瘤化疗的疗效。研究发现，与单纯采用阿霉素（Dox）进行化疗相比，荷瘤小鼠尾静脉注射 Man-HA-MnO<sub>2</sub> 纳米粒子后，辅助采用 Dox 进行化疗，可以显著减小肿瘤体积及提高其 ADC 值。同时，Man-HA-MnO<sub>2</sub> 纳米粒子可以作为一种智能磁共振分子影像探针，对肿瘤进行定位和诊断。磁共振低信号的 Man-HA-MnO<sub>2</sub> 纳米粒子，在肿瘤组织的缺血缺氧区域与内源性 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 响应后，释放 Mn<sup>2+</sup>，特定部位反应为具有磁共振增强作用的 Mn<sup>2+</sup>，显著提高肿瘤纵向弛豫率 r<sub>1</sub> 和横向弛豫率 r<sub>2</sub>，增强肿瘤部位的 T1、

T2 加权磁共振成像效果。

**关键词:** 缺血缺氧 肿瘤相关巨噬细胞 化疗 二氧化锰 透明质酸 甘露糖受体

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstract

Hypoxia, defined as a decrease of tissue oxygen level, is a characteristic feature of locally advanced solid tumors, resulting from an imbalance between the intake and consumption of oxygen caused by abnormal vessels in the tumor and the rapid proliferation of cancer cells. Hypoxia represents a key microenvironmental stressor governing multiple phenomena associated with tumor progression such as proliferation, angiogenesis and metastasis. Hypoxia promotes not only the invasiveness of tumor cells, but also chemoresistance in cancer. Tumor associated macrophages (TAMs) residing at the site of hypoxic region of tumors have been known to cooperate with tumor cells, and promote proliferation and chemoresistance. Therefore, there is an urgent need for new strategies to alleviate tumor hypoxia and enhance chemotherapy response in solid tumors. Herein, we have taken advantage of high accumulation of TAMs in hypoxic regions of tumor and high reactivity of manganese dioxide nanoparticles (MnO<sub>2</sub> NPs) toward hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) for the simultaneous production of O<sub>2</sub> and regulation of pH to effectively alleviate tumor hypoxia by targeted delivery of MnO<sub>2</sub> NPs to the hypoxic area. Furthermore, we also utilized the ability of hyaluronic acid (HA) modification in reprogramming anti-inflammatory, pro-tumoral M2 TAMs to pro-inflammatory, antitumor M1 macrophages to further enhance the ability of MnO<sub>2</sub> NPs to lessen tumor hypoxia and modulate chemoresistance. The HA-coated, mannan-conjugated MnO<sub>2</sub> particle (Man-HA-MnO<sub>2</sub>) treatment significantly increased tumor oxygenation and down-regulated hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the tumor. Combination treatment of the tumors with Man-HA-MnO<sub>2</sub> NPs and doxorubicin significantly increased apparent diffusion coefficient (ADC) values of breast tumor, inhibited tumor growth and tumor cell proliferation as compared with chemotherapy alone. In addition, the reaction of Man-HA-MnO<sub>2</sub> NPs toward endogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> highly enhanced T1- and T2- MRI performance for tumor imaging and detection.

**Keywords:** hypoxia, tumor associated macrophages (TAMs), chemotherapy response, manganese dioxide (MnO<sub>2</sub>), hyaluronic acid (HA), mannose receptor

## 目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
第一章 绪论.....	1
1.1 研究背景.....	1
1.1.1 肿瘤微环境概述.....	1
1.1.2 肿瘤相关巨噬细胞.....	2
1.1.3 肿瘤耐药机制.....	6
1.1.4 磁共振增强造影剂现状.....	8
1.2 本课题设计思路.....	10
第二章 Man-HA-MnO <sub>2</sub> 纳米粒子的制备和表征 .....	12
2.1 实验仪器与材料.....	12
2.2 实验方法.....	13
2.3 纳米粒子的制备和表征结果.....	15
2.3.1 Man-HA-MnO <sub>2</sub> 纳米粒子的制备.....	15
2.3.2 Man-HA-MnO <sub>2</sub> 纳米粒子的表征.....	17
2.4 本章小结.....	23
第三章 Man-HA-MnO <sub>2</sub> 纳米粒子靶向性和生物分布研究 .....	24
3.1 实验仪器与材料.....	24
3.2 实验方法.....	27
3.3 纳米粒子靶向性和生物分布结果.....	33
3.3.1 Man-HA-MnO <sub>2</sub> 纳米粒子的细胞毒性实验分析.....	33
3.3.2 Man-HA-MnO <sub>2</sub> 纳米粒子的靶向性分析.....	34
3.3.3 Man-HA-MnO <sub>2</sub> 纳米粒子的生物分布规律分析.....	37
3.4 本章小结.....	41
第四章 Man-HA-MnO <sub>2</sub> 纳米粒子的响应特性分析.....	43
4.1 实验仪器与材料.....	43
4.2 实验方法.....	44

<b>4.3 纳米粒子响应特性分析结果</b> .....	<b>49</b>
4.3.1 Man-HA-MnO <sub>2</sub> 纳米粒子体外响应特性分析.....	50
4.3.2 Man-HA-MnO <sub>2</sub> 纳米粒子体外样品磁共振特性增强分析.....	53
4.3.3 Man-HA-MnO <sub>2</sub> 纳米粒子在细胞水平的响应特性分析.....	57
4.3.4 Man-HA-MnO <sub>2</sub> 纳米粒子细胞水平磁共振特性增强分析.....	60
4.3.5 Man-HA-MnO <sub>2</sub> 纳米粒子动物水平磁共振特性增强分析.....	64
4.3.6 Man-HA-MnO <sub>2</sub> 纳米粒子改善肿瘤缺氧状况分析.....	72
<b>4.4 本章小结</b> .....	<b>76</b>
<b>第五章 Man-HA-MnO<sub>2</sub> 纳米粒子对肿瘤相关巨噬细胞表型转化作用的研究</b> .....	<b>78</b>
<b>5.1 实验仪器与材料</b> .....	<b>78</b>
<b>5.2 实验方法</b> .....	<b>79</b>
<b>5.3 纳米粒子诱导肿瘤相关巨噬细胞表型转化结果</b> .....	<b>84</b>
5.3.1 Man-HA-MnO <sub>2</sub> 纳米粒子诱导 M2 型巨噬细胞表型转化为 M1 型巨噬细胞.....	84
5.3.2 Man-HA-MnO <sub>2</sub> 纳米粒子诱导肿瘤相关巨噬细胞表型转化为 M1 型巨噬细胞.....	89
5.3.3 Man-HA-MnO <sub>2</sub> 纳米粒子诱导肿瘤中肿瘤相关巨噬细胞表型转化.....	92
<b>5.4 本章小结</b> .....	<b>96</b>
<b>第六章 Man-HA-MnO<sub>2</sub> 纳米粒子增强肿瘤化疗效果</b> .....	<b>98</b>
<b>6.1 实验仪器与材料</b> .....	<b>98</b>
<b>6.2 实验方法</b> .....	<b>99</b>
<b>6.3 纳米粒子增强肿瘤化疗效果</b> .....	<b>101</b>
6.3.1 Man-HA-MnO <sub>2</sub> 纳米粒子增强肿瘤化疗效果.....	101
6.3.2 Man-HA-MnO <sub>2</sub> 纳米粒子改善肿瘤缺氧状况的免疫荧光染色分析... ..	105
6.3.3 Man-HA-MnO <sub>2</sub> 纳米粒子增强化疗效果特性的细胞实验研究.....	110
<b>6.4 本章小结</b> .....	<b>111</b>
<b>第七章 结论和展望</b> .....	<b>112</b>
<b>附 录</b> .....	<b>114</b>
<b>参考文献</b> .....	<b>116</b>
<b>致 谢</b> .....	<b>125</b>
<b>在学期间发表论文</b> .....	<b>127</b>

## Table of Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract in English</b> .....	<b>III</b>
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Research background</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Microenviroment of tumor.....	1
1.1.2 Tumor-associated macrophage.....	2
1.1.3 Mechanisms of tumor chemical resistance.....	6
1.1.4 Enhanced MRI contrast agent.....	8
<b>1.2 The concept of this paper</b> .....	<b>10</b>
<b>Chapter 2 Preparation and characterization of Man-HA-MnO<sub>2</sub> nanoparticles</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1 Instruments and materials</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2 Methods</b> .....	<b>13</b>
<b>2.3 Preparation and characterization results of nanoparticles</b> .....	<b>15</b>
2.3.1 Preparation of Man-HA-MnO <sub>2</sub> nanoparticles.....	15
2.3.2 Characterization of Man-HA-MnO <sub>2</sub> nanoparticles.....	17
<b>2.4 Summary</b> .....	<b>23</b>
<b>Chapter 3 Targeting and biodistribution studies of Man-HA-MnO<sub>2</sub> nanoparticles</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1 Instruments and materials</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2 Methods</b> .....	<b>27</b>
<b>3.3 Targeting and biodistribution results of nanoparticles</b> .....	<b>33</b>
3.3.1 Cell toxicity analysis of Man-HA-MnO <sub>2</sub> nanoparticles.....	33
3.3.2 Targeting analysis of Man-HA-MnO <sub>2</sub> nanoparticles.....	34
3.3.3 Biodistribution analysis of Man-HA-MnO <sub>2</sub> nanoparticles.....	37
<b>3.4 Summary</b> .....	<b>41</b>
<b>Chapter 4 Response characteristics analysis of Man-HA-MnO<sub>2</sub> nanoparticles</b> .....	<b>43</b>
<b>4.1 Instruments and materials</b> .....	<b>43</b>
<b>4.2 Methods</b> .....	<b>44</b>
<b>4.3 Response characteristics results of nanoparticles</b> .....	<b>49</b>

4.3.1 In vitro response characteristics of Man-HA-MnO <sub>2</sub> nanoparticles.....	50
4.3.2 In vitro MRI enhancements of Man-HA-MnO <sub>2</sub> nanoparticles.....	53
4.3.3 Response characteristics in cell of Man-HA-MnO <sub>2</sub> nanoparticles.....	57
4.3.4 MRI enhancements in cell of Man-HA-MnO <sub>2</sub> nanoparticles.....	60
4.3.5 In vivo response characteristics of Man-HA-MnO <sub>2</sub> nanoparticles.....	64
4.3.6 Tumor hypoxia improvement analysis of Man-HA-MnO <sub>2</sub> nanoparticles...	72
<b>4.4 Summary.....</b>	<b>76</b>
<b>Chapter 5 Phenotypic transformation effects to tumor-associated macrophage of Man-HA-MnO<sub>2</sub> nanoparticles .....</b>	<b>78</b>
<b>5.1 Instruments and materials.....</b>	<b>78</b>
<b>5.2 Methods.....</b>	<b>79</b>
<b>5.3 Phenotypic transformation effects to tumor-associated macrophage of nanoparticles .....</b>	<b>84</b>
5.3.1 M2 macrophage phenotypic transform to M1 macrophage effects of Man-HA-MnO <sub>2</sub> nanoparticles.....	84
5.3.2 Tumor-associated macrophage phenotypic transform to M1 macrophage effects of Man-HA-MnO <sub>2</sub> nanoparticles.....	89
5.3.3 Phenotypic Transition effects to tumor-associated macrophage in tumor of Man-HA-MnO <sub>2</sub> nanoparticles.....	92
<b>5.4 Summary.....</b>	<b>96</b>
<b>Chapter 6 Enhanced chemotherapy effect to tumor of Man-HA-MnO<sub>2</sub> nanoparticles.....</b>	<b>98</b>
<b>6.1 Instruments and materials.....</b>	<b>98</b>
<b>6.2 Methods.....</b>	<b>99</b>
<b>6.3 Enhanced chemotherapy effect to tumor of nanoparticles.....</b>	<b>101</b>
6.3.1 Enhanced chemotherapy to tumor of Man-HA-MnO <sub>2</sub> nanoparticles.....	101
6.3.2 Tumor hypoxia improvement analysis used immunofluorescent of Man-HA-MnO <sub>2</sub> nanoparticles.....	105
6.3.3 Enhanced chemotherapy in cell of Man-HA-MnO <sub>2</sub> nanoparticles.....	110
<b>6.4 Summary.....</b>	<b>111</b>
<b>Chapter 7 Conclusion and prospect.....</b>	<b>112</b>
<b>Appendix.....</b>	<b>114</b>
<b>Reference.....</b>	<b>116</b>
<b>Acknowledgement.....</b>	<b>125</b>
<b>Publications.....</b>	<b>127</b>

# 第一章 绪论

## 1.1 研究背景

### 1.1.1 肿瘤微环境概述

肿瘤微环境是肿瘤所处的内环境,是肿瘤细胞赖以生存的“土壤”,在肿瘤的发生及进展过程中起到至关重要的作用。肿瘤微环境主要由基质细胞、微血管、细胞外基质、相关细胞因子、激素以及少量浸润细胞等组成,是一个复杂的综合系统,各因素之间协同作用,调节肿瘤的增殖、侵袭、迁移、粘附、血管新生等过程<sup>[1]</sup>。其中,基质细胞主要包括成纤维细胞、肌纤维母细胞及骨髓源性抑制细胞、肥大细胞、巨噬细胞等,并与肿瘤细胞相互作用,分泌多种细胞因子(IL-10、TGF- $\beta$ 、VEGF、PGE2)、细胞趋化因子以及基质蛋白酶等,可改变组织间的渗透压、改变肿瘤组织的营养代谢环境、促进肿瘤血管新生等,使其更加有利于肿瘤的增殖、侵袭和转移<sup>[2,3,4]</sup>。

氧分子(O<sub>2</sub>)是有氧代谢过程中维持细胞内生物能量的必须成分,在机体许多有机和无机反应中可作为电子受体。O<sub>2</sub>浓度的异常改变通常会引起代谢异常,导致包括中风、组织缺血、炎症和实体瘤缺氧等多种病理情况的发生发展。肿瘤乏氧,是指实体肿瘤内部的氧分压低于正常氧分压。多数哺乳动物组织的氧分压为2% - 9% (平均为400 mm Hg),氧分压  $\leq$  2%定义为乏氧状态<sup>[5]</sup>。组织轻度乏氧状态时氧分压  $\leq$  2%,重度乏氧状态时氧分压  $\leq$  0.02%。肿瘤生长迅速,生长过程中需要消耗大量O<sub>2</sub>和营养物质,随着肿瘤体积的不断变大,肿瘤血管的生长速度往往不能满足肿瘤迅速生长对于O<sub>2</sub>和营养物质的需要,出现供血不足,导致肿瘤内部乏氧<sup>[6,7]</sup>。肿瘤乏氧根据形成原因可分为急性缺氧和慢性缺氧。急性缺氧主要是由于肿瘤微血管的结构、功能异常,导致血流灌注异常,致使O<sub>2</sub>向肿瘤细胞的输送过程出现异常,通常为一过性和暂时性缺氧。慢性缺氧主要是由于肿瘤中O<sub>2</sub>的弥散存在一定的距离限制,一般认为当肿瘤细胞与肿瘤血管之间的距离大于70  $\mu$ m,超过O<sub>2</sub>的弥散距离,肿瘤细胞便处于乏氧状态<sup>[8,9]</sup>。临床研究发现,多数恶性肿瘤进展过程中都会出现内部乏氧,乏氧区域往往伴随肿瘤坏死,更有利于肿瘤侵袭、转移。同时肿瘤组织乏氧区域,肿瘤细胞出现适

应性反应，分泌多种细胞因子、生长因子和转录调控因子等，如促红细胞生成素（EPO）、糖酵解酶等分泌增加，缺氧诱导因子-1 $\alpha$ （HIF-1 $\alpha$ ）表达上调<sup>[3]</sup>。HIF-1 $\alpha$ 是调节血管生成的重要因子之一，调控多种血管生成因子的表达<sup>[4]</sup>。其中包括，时 HIF-1 $\alpha$  表达上调能够促使血管内皮生长因子（VEGF）表达上调，影响肿瘤血管新生及肿瘤的增殖、侵袭、转移等过程<sup>[10]</sup>。

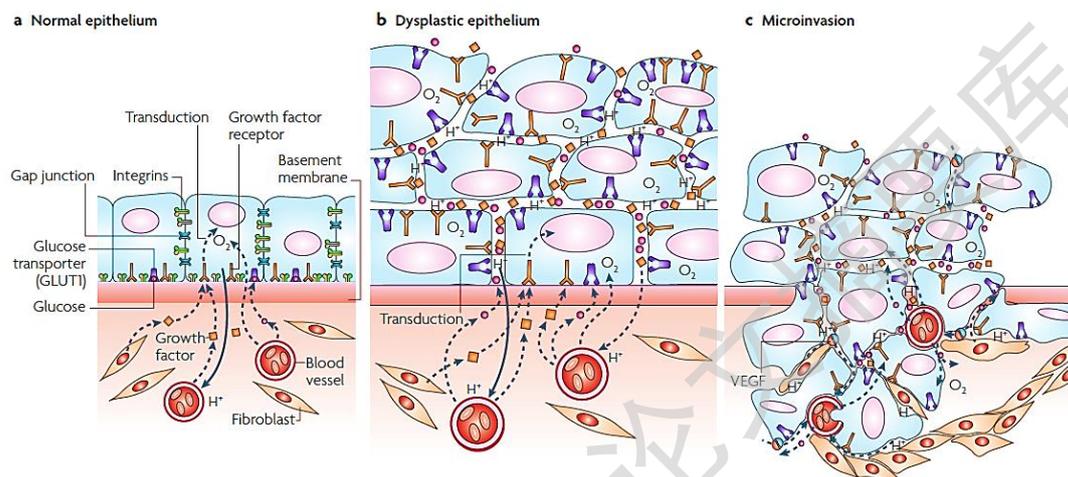


图 1.1 肿瘤微环境中肿瘤细胞的侵袭过程示意图<sup>[1]</sup>

肿瘤在乏氧状态下，肿瘤细胞代谢过程中三羧酸循环发生障碍，转而多进行无氧糖酵解，释放大量乳酸。同时，乏氧区域肿瘤组织周围脉管系统不完备，代谢产物不能及时排除，使得肿瘤乏氧区域 pH 值降低。另外，肿瘤乏氧时 HIF-1 调控下游基因增加碳酸酐酶的表达，碳酸酐酶能够可逆催化二氧化碳水化为碳酸，进一步增强肿瘤微环境酸性程度<sup>[11]</sup>。

### 1.1.2 肿瘤相关巨噬细胞

肿瘤相关巨噬细胞（Tumor-associated macrophage, TAMs），通常是指浸润在肿瘤组织中的巨噬细胞，可通过多种作用机制调控肿瘤血管生成、肿瘤细胞外基质重塑、肿瘤细胞的增殖侵袭和转移、抑制获得性免疫等，在肿瘤进展过程中发挥重要作用<sup>[12]</sup>。

巨噬细胞与其他免疫效应细胞一样，有很多亚型。通过Th1/Th2免疫应答过程分类，巨噬细胞能被极化为两种不同的表型，即经典活化的（Classically activated macrophage, M1型）巨噬细胞和替代性活化的（Alternatively activated macrophage, M2型）巨噬细胞<sup>[13,14]</sup>。M1型巨噬细胞主要由Th1型细胞因子如干扰素- $\gamma$ （INF- $\gamma$ ）单独作用，或与细菌分泌的脂多糖（LPS）、细胞激素如肿瘤坏

死因子- $\alpha$  (LPS- $\alpha$ ) 协同作用, 诱导分化而来<sup>[15]</sup>。M2型巨噬细胞分为M2a、M2b、M2c三种表型, 其中M2a型巨噬细胞主要由Th2型细胞因子如IL-4或IL-13诱导分化; M2b型巨噬细胞主要由免疫复合物(ICs)、TLRs或IL-1受体拮抗剂诱导分化; M2c型巨噬细胞主要由IL-10、转录生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 或糖皮质激素(GCs)<sup>[16,17]</sup>。M1型巨噬细胞高度表达促进炎症进程的细胞因子(如, TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6和IL-23), IL-12表达增加, 而IL-10表达减少<sup>[18]</sup>。同时, M1型巨噬细胞能够增加H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、氧自由基、超氧阴离子、过氧化硝酸盐等的分泌, 增加肿瘤细胞杀伤活性, 具有抗肿瘤的特性<sup>[19,20]</sup>。另外, M1型巨噬细胞能够高度表达MHC I和II类抗原, 分泌介导吞噬作用的补体因子。M1型巨噬细胞中诱导型一氧化氮酶合酶(iNOS)表达上调, 能够促进精氨酸代谢为NO和瓜氨酸<sup>[21,22]</sup>。与此相对, M2型巨噬细胞多表达SR、甘露糖受体(MR)和IL-10, 而IL-12表达减少, 主要参与组织重建、免疫调节和促进肿瘤进展过程等<sup>[23,24,25]</sup>。

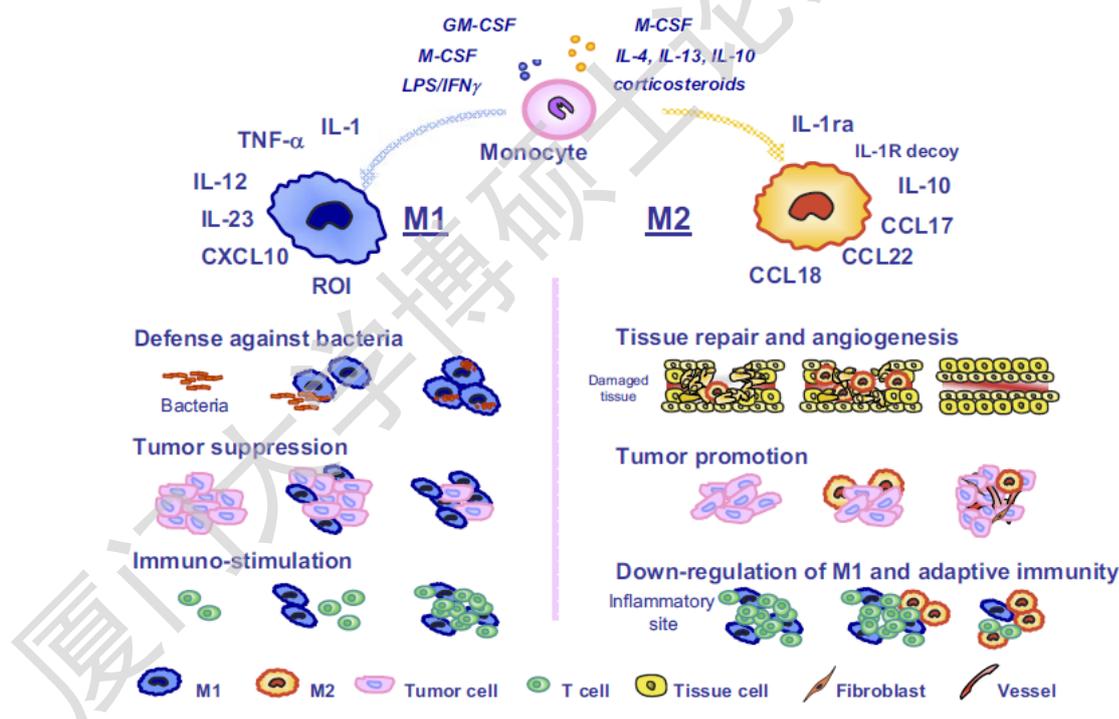


图 1.2 巨噬细胞极化特点及功能示意图<sup>[16]</sup>

有研究表明, 肿瘤细胞实际处于慢性炎症环境之中, 来自于单核-巨噬细胞系统的炎症细胞是肿瘤间质的重要组成部分<sup>[26,27]</sup>。肿瘤分泌多种肿瘤衍生趋化因子(如, CCL2、CCL3和CCL12等), 招募外周血单核细胞趋化到肿瘤部位, 定向诱导分化形成肿瘤相关巨噬细胞<sup>[28,29]</sup>。在肿瘤进展早期时, 炎症浸润过程中巨噬

细胞多为M1型巨噬细胞，随着肿瘤乏氧和高乳酸等微环境的持续作用，巨噬细胞逐步极化为具有M2型巨噬细胞特征的肿瘤相关巨噬细胞<sup>[30]</sup>。肿瘤相关巨噬细胞浸润在肿瘤微环境中，通常具有M2型巨噬细胞的特征，与肿瘤乏氧的微环境密切相关，肿瘤相关巨噬细胞的招募和极化水平，很大程度上与肿瘤乏氧的程度相关<sup>[31]</sup>。乏氧程度越严重的区域，肿瘤相关巨噬细胞的富集越多。同时，肿瘤相关巨噬细胞可通过调控多种作用机制，促进肿瘤进展过程，如调控肿瘤血管新生和淋巴管生成、细胞外基质重塑、肿瘤的生长侵袭和转移、抑制获得性免疫等<sup>[32]</sup>。

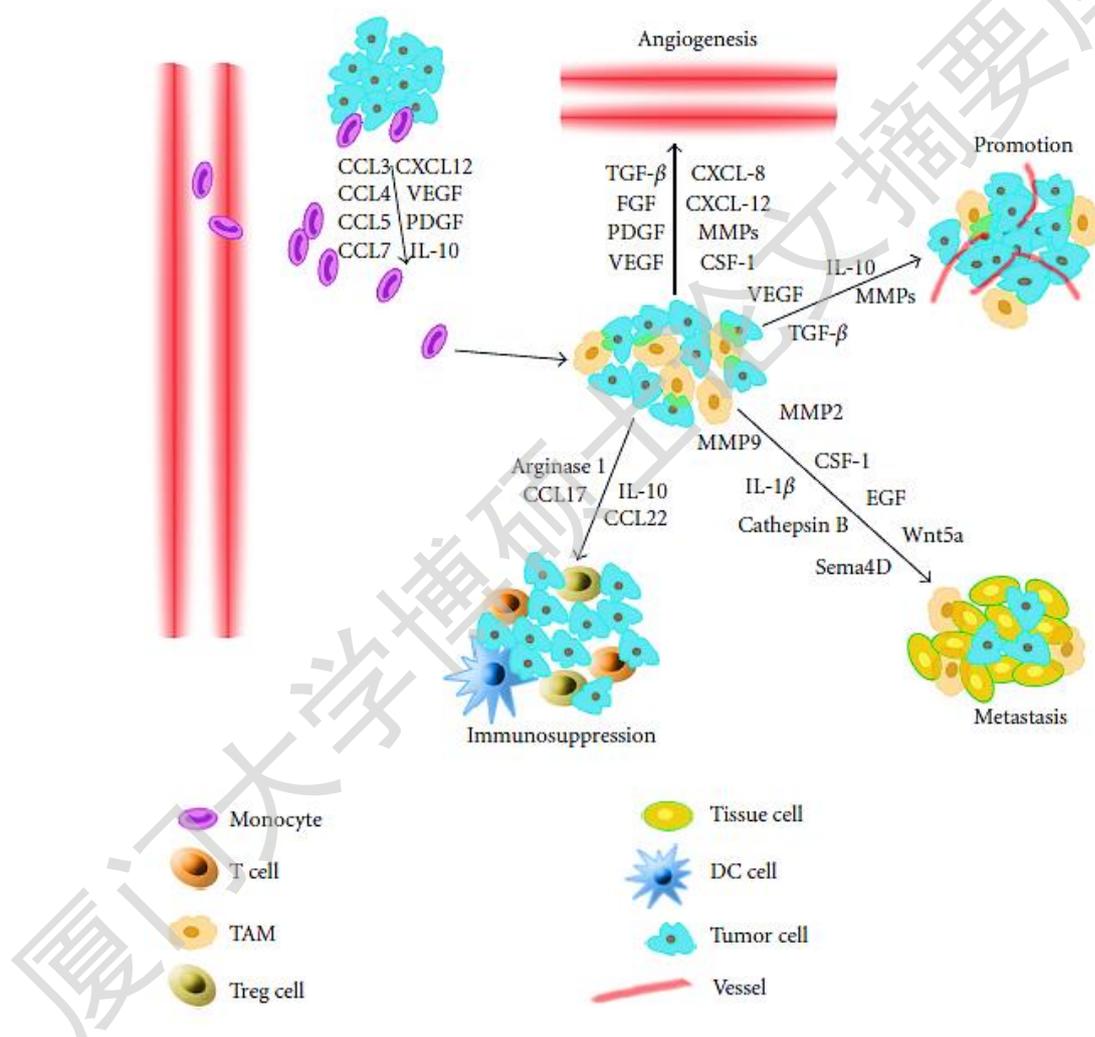


图 1.3 肿瘤相关巨噬细胞促进肿瘤进展作用示意图<sup>[23]</sup>

肿瘤相关巨噬细胞能够影响肿瘤的生长、侵袭和转移过程。研究表明，肿瘤相关巨噬细胞的浸润程度与多种实体肿瘤细胞（如，乳腺癌、子宫内膜癌等）的增殖呈正相关<sup>[33,34,35]</sup>。肿瘤相关巨噬细胞通过分泌细胞因子 IL-23，上调 MMP-9，刺激炎症反应，进而促进肿瘤的生长。另外，肿瘤相关巨噬细胞还可以通过 eNOS 信号通路活化、抑制肾上腺素受体等途径，促进肿瘤生长<sup>[36,37,38]</sup>。肿瘤相关巨噬

细胞参与肿瘤细胞向周围正常组织的侵袭、转移过程<sup>[39,40,41]</sup>。肿瘤的转移程度是评价肿瘤严重程度的重要指标,肿瘤通过血管和淋巴管转移。其中,肿瘤相关巨噬细胞通过分泌 MMP (如, MMP-2、MMP-9 等) 以及多种蛋白水解酶、组织蛋白酶等,破坏细胞间连接、基底膜,降解细胞外基质 (ECM), 激活 c-JNK 和 NF- $\kappa$ B 信号通路等促进肿瘤的侵袭和转移<sup>[42,43,44]</sup>。肿瘤相关巨噬细胞释放 EGF 与肿瘤细胞释放的 CSF-1 协同作用, 促进肿瘤侵袭转移<sup>[45]</sup>。

肿瘤相关巨噬细胞能够调控肿瘤血管新生和淋巴管生成。研究表明,肿瘤微环境中的肿瘤相关巨噬细胞分泌生长因子、细胞因子、趋化因子等, 包括如 VEGF、PDGF、TGF- $\beta$ 、IL-8、CCL8、TNF- $\alpha$  等调节和诱导神经胶质瘤、乳腺癌、膀胱癌和前列腺癌等肿瘤血管新生<sup>[46,47]</sup>。此外,肿瘤相关巨噬细胞高度表达基质金属蛋白酶 (如, MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9 和 MMP-12)、纤溶酶、尿激酶纤溶酶原等也有利于肿瘤血管生成。在肿瘤缺氧微环境的作用下,使得缺氧诱导转录因子 HIF-1、HIF-2 表达上调, 诱导多种血管生成因子如 VEGF 等大量分泌, 进而促进肿瘤血管新生<sup>[48,49]</sup>。淋巴管生成状态可作为临床不良预后的初步指征。肿瘤相关巨噬细胞可通过 VEGFR3 调控 VEGF-C、VEGF-D 分泌, 进而介导淋巴管的生成。另外,肿瘤相关巨噬细胞还可以通过上调淋巴管生成因子等表达, 促进淋巴管的生成<sup>[50]</sup>。

肿瘤相关巨噬细胞能够调节肿瘤免疫抑制过程。肿瘤相关巨噬细胞大量分泌的细胞因子和蛋白酶, 如 TGF- $\beta$ 、IL-10、精氨酸酶-1 等可使免疫抑制。TGF- $\beta$  通过抑制 NK 细胞的细胞溶解活性、降低 DC 的迁移及抗原呈递、促进 CD4+ T 细胞分化为 Th1 细胞, 加深免疫抑制作用<sup>[51,55]</sup>。IL-10 是一种有助于肿瘤免疫逃逸的抗炎、免疫抑制细胞因子, 能够降低抗原呈递。IL-10 可抑制 IFN- $\gamma$  表达, 进而刺激幼稚 T 细胞分化, 促进肿瘤免疫逃逸过程<sup>[53,54]</sup>。精氨酸酶-1 使 L-精氨酸代谢成多胺和脯氨酸, 使 T 细胞受体 (TCR) 信号的失调, 随后诱导 CD8+ T 细胞无反应, 实现肿瘤免疫抑制作用<sup>[55]</sup>。肿瘤相关巨噬细胞通过调节趋化因子 (如, CCL-17、CCL-22) 表达, 抑制细胞毒性 T 细胞浸润, 引起免疫抑制。另外,肿瘤相关巨噬细胞可诱导免疫抑制与激活相关的基因, 如 STST3、STST6、NF- $\kappa$ B 等, 介导肿瘤免疫抑制过程<sup>[56]</sup>。

透明质酸 (HA) 作为一种天然高分子, 在药物传递系统等领域有广泛的应用。研究表明, 高分子量的 HA 作为广泛存在的细胞外基质成分, 在维持组织完

整性和水平中发挥重要作用，具有抗炎作用。然而，在组织损伤时，细胞外基质中高分子量的 HA 分解为低分子量的 HA 片段，可作为免疫系统的报警信号，可激活先天免疫应答过程。大量文献指出，低分子量 HA 为单核细胞或巨噬细胞免疫系统的免疫应答信号源，可通过介导 TLR2-MyD88-IRAK1-TRAF6-PKC $\zeta$ -NK- $\kappa$ B 或 TLR4-TRIF-TBK1-IRF3 免疫依赖途径，激活先天免疫应答，引起巨噬细胞表型变化<sup>[57,58,59,60]</sup>。

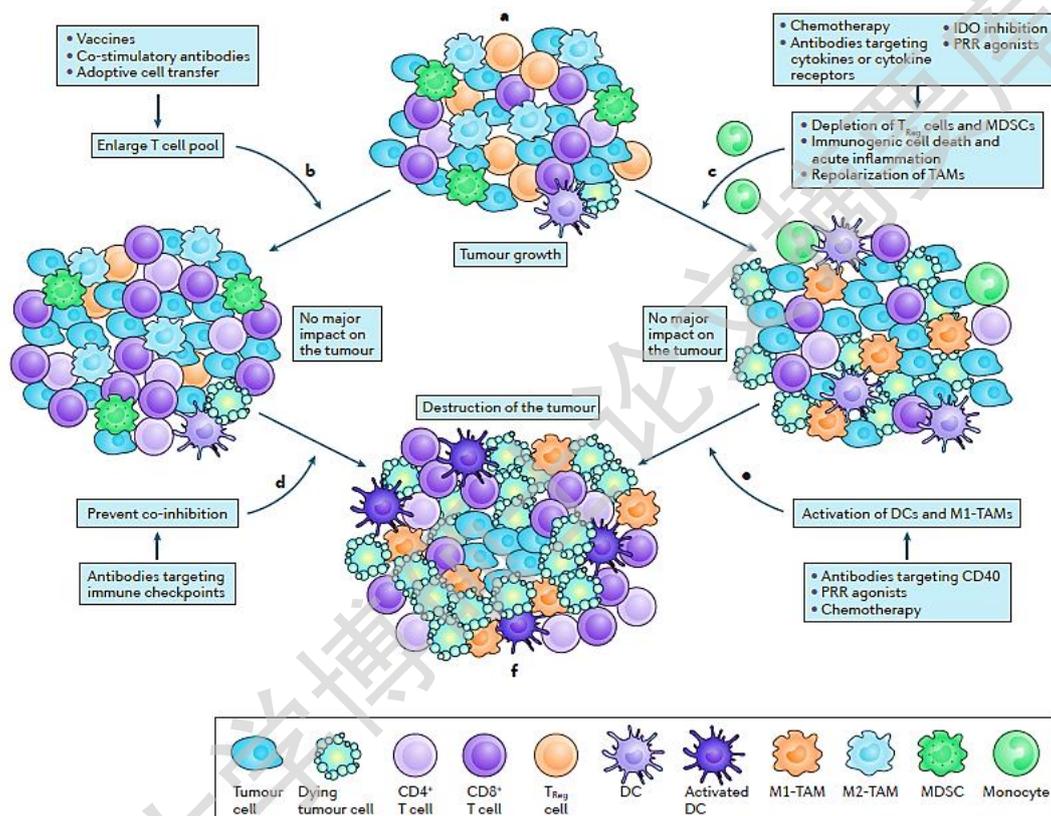


图 1.4 肿瘤相关巨噬细胞表型转化的肿瘤免疫治疗策略示意图<sup>[62]</sup>

通过一定策略，诱导肿瘤相关巨噬细胞表型转化为具有抗肿瘤特性的 M1 型巨噬细胞，可正常化肿瘤血管及提高肿瘤免疫抗性<sup>[61]</sup>、抑制肿瘤转移<sup>[62]</sup>、调节 T 细胞免疫过程<sup>[63]</sup>等途径进行肿瘤治疗。另外还有靶向肿瘤相关巨噬细胞进行基因传送治疗，以改善肿瘤缺氧状况<sup>[64]</sup>，进行肿瘤治疗。这些新型治疗策略的提出，为肿瘤治疗提供新思路。

### 1.1.3 肿瘤耐药机制

肿瘤在缺氧状态下，肿瘤细胞对于放射治疗和化学治疗均具有耐受性，使得肿瘤对放射治疗和药物化疗的抵抗性增强，显著降低肿瘤病人的生存率<sup>[2,64]</sup>。同时，肿瘤缺氧区域的肿瘤相关巨噬细胞也与肿瘤耐药密切相关。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.