



Role of Putative Phosphorylation Sites on Tie2 Receptor in the Interaction between Tumor-Associated Macrophages and Human Endothelial Cells

Zahra Mohseni¹✉, Seyed Mahdi Nassiri²✉, Khosro Hoseini Pajooh³✉, Zahra Habibi-Kelishomi⁴✉, Bahram Goliaei⁴✉

¹ Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

² Department of Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

³ Department of Biothecnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Iran

⁴ Department of Biophysics, College of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 8 July 2023, Accepted: 20 September 2023



[10.22059/jvr.2023.354283.3323](https://doi.org/10.22059/jvr.2023.354283.3323)



[20.1001.1.20082525.1402.78.4.1.9](https://doi.org/10.1001.1.20082525.1402.78.4.1.9)

Abstract

BACKGROUND: Recently, a subpopulation of monocytes expressing Tie2 receptors has been identified, playing an important role in tumor angiogenesis. Selective depletion of Tie2-expressing monocytes in tumor-bearing mice can inhibit tumor angiogenesis. Some of these macrophages have been shown to be located near the tumor blood vessels, forming vessels in these areas paracrinely during the angiogenesis process.

OBJECTIVES: This study aims to investigate the role of putative phosphorylation sites on Tie2 receptor in tumor-associated macrophages connected to human endothelial cells.

METHODS: In this study, we used a series of Tie2 mutants. After transfection of tumor-associated macrophages with these mutants, they were evaluated for physical connection using the surface plasmon resonance technique and by non-contact co-culture of these macrophages with endothelial cells.

RESULTS: Mutation in the tyrosine residues 1106 and 1111 had an inhibitory effect on macrophage binding to endothelial cells, resulting in deterioration of the angiogenic activity of these cells.

CONCLUSIONS: Tie2 receptor and its downstream molecular pathways such as AKT/PI3 have a role in the interaction of tumor-associated macrophages with human endothelial cells, directly (via physical binding) and indirectly (through secretion of factors affecting angiogenesis). This emphasize the importance of the molecular mechanisms of Tie2 receptor activation in the interactions of endothelial cells with tumor-associated macrophages and as an anti-angiogenic therapy for cancer.

Keywords: Angiogenesis, Endothelial cells, Phosphorylation sites, Tie 2, Tumor associated macrophages

Copyright © Journal of Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s).

Publisher: University of Tehran

Conflict of interest: The authors declared no conflict of interest.

Corresponding author: Seyed Mahdi Nassiri, Tel/Fax: +9821-61117128



How to cite this article:

Mohseni Z, Nasiri SM, Hoseini Pajooh K, Habibi-Kelishomi Z, Goliaei B. Role of Putative Phosphorylation Sites on Tie2 Receptor in the Interaction between Tumor-Associated Macrophages and Human Endothelial Cells. J Vet Res, 2023; 78(4): 235-246. doi: 10.22059/jvr.2023.354283.3323

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Quantitative analysis of angiogenesis by examining 25 colonies per well.

Figure 2. The average length of each tube (in μm) in five microscopic fields using an image analyzer (Sight DS-L2, Nikon)

Figure 3. Tube formation on matrigel after Tie2 mutation in (A) all residues, (B) residue 1100, (C) residue 1106, and (D) residue 1111.

Figure 4. (A) Physical interaction of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) with macrophages using surface plasmon resonance (SPR) method; (B) HUVEC culture on SPR sensing gold chips: SPR curve of gold chips before and after cell culture; (C) Sensogram of macrophages with different Tie2 mutations on an HUVEC monolayer.



نقش جایگاه‌های مهم فسفریلاسیون پذیرنده Tie 2 در برهمکنش ماکروفاژهای تومور و

سلول‌های اندوتلیال

زهرا محسنی^۱، سیدمهدی نصیری^۲، خسرو حسینی پژوه^۳، زهرا حبیبی کلیشمی^۴، بهرام گلیایی^۴^۱ دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران^۲ گروه کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران^۳ گروه زیست انرژی و فرآیندهای تبدیلی، پژوهشکده زیست فناوری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، ایران^۴ گروه بیوفیزیک، دانشکده بیوشیمی بیوفیزیک دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۷ تیر ماه ۱۴۰۲، تاریخ پذیرش: ۲۹ شهریور ماه ۱۴۰۲

doi 10.22059/jvr.2023.354283.3323



20.1001.1.20082525.1402.78.4.1.9

چکیده

زمینه مطالعه: در سال‌های اخیر تحت جمعیت جدیدی از مونوسیت‌ها که پذیرنده Tie2 را بیان می‌کنند و در رگ‌زایی تومور نقش بسزایی دارند، شناسایی شده‌اند. همچنین مشخص شده است که حذف انتخابی مونوسیت‌های بیان‌کننده Tie2 سبب نقص رگ‌زایی در تومورهای موش و تحلیل متعاقب تومور می‌گردد. علاوه بر این نشان داده شده که برخی از این ماکروفاژها در مجاورت عروق خونی تومور مستقر می‌شوند و به شکل پاراکراین از عروق در حال تشکیل در این مناطق طی فرایند رگ‌زایی حمایت می‌کنند.

هدف: بررسی نقش جایگاه‌های مهم فسفریلاسیون پذیرنده Tie2 در برهمکنش ماکروفاژهای تومور و سلول‌های اندوتلیال.

روش کار: در مطالعه حاضر با هدف بررسی نقش هر یک از جایگاه‌های فسفریلاسیون پذیرنده Tie2 در اتصال فیزیکی ماکروفاژها به سلول‌های اندوتلیال و نیز نقش آن‌ها در رگ‌زایی از یکسری از وکتورهای با Tie2 جهش‌یافته استفاده شد. پس از ترانسفکت ماکروفاژهای مشتق از تومور با این وکتورهای جهش یافته با استفاده از روش SPR اتصال فیزیکی بین سلول اندوتلیال و ماکروفاژها ارزیابی و با هم‌کشنی این ماکروفاژها با سلول‌های اندوتلیال میزان رگ‌زایی بررسی شد. **نتایج:** موتاسیون در جایگاه‌های ۱۱۰۶ و ۱۱۱۱ فسفریلاسیون Tie2 سبب کاهش اتصال ماکروفاژهای تومور به سلول‌های اندوتلیال شده و اثر ممانعتی در فعالیت پروآنژیوژنیک آن‌ها دارد.

نتیجه‌گیری نهایی: به طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهنده اهمیت پذیرنده Tie2 و مسیرهای مولکولی پایین‌دست آن در کنش متقابل سلول‌های ماکروفاژ و سلول‌های اندوتلیال و نیز القای آنژیوژنز هم به صورت مستقیم به شکل ارتباط فیزیکی و هم غیرمستقیم از طریق ترشح فاکتورهای مؤثر بر رگ‌زایی بود. در نتیجه این یافته‌ها اهمیت درک مکانیسم‌های مولکولی فعال‌سازی پذیرنده Tie2 در برهمکنش‌های سلول‌های اندوتلیال با ماکروفاژهای تومور و نیز درمان‌های ضد رگ‌زایی سرطان را ضروری می‌سازد.

کلمات کلیدی: جایگاه‌های فسفریلاسیون، رگ‌زایی، سلول‌های اندوتلیال، ماکروفاژهای مرتبط با تومور، Tie2

کپی‌رایت © مجله تحقیقات دامپزشکی؛ دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.



نویسنده مسئول: سیدمهدی نصیری، گروه کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

مقدمه

پس از آن‌که Folkman در سال ۱۹۷۱ برای نخستین بار فرضیه وابسته بودن رشد تومورها به رگ‌زایی را مطرح نمود (۱). روش‌های مختلف درمانی با هدف مهار رگ‌زایی تومور، در حال تحقیق و توسعه می‌باشند. نتایج مطالعات مختلف نشان داده که ماکروفاژهای مرتبط با تومور (TAM) هم رگ‌زایی و هم متاستاز تومور را افزایش می‌دهند. به نظر می‌رسد اعمال پیش توموری TAMs حداقل تا حدودی

بستگی به تولید فاکتورهای رشد، فاکتورهای بازسازی بافتی و تعدیل کننده سیستم ایمنی دارد. علاوه بر این TAMs در شروع رگ‌زایی تومور که در مراحل اولیه تبدیل ضایعات هیپرپلاستیک به کارسینوم‌ها رخ می‌دهد، نقش دارند. یک زیر مجموعه منحصر به فرد از مونوسیت‌ها، که بیان کننده پذیرنده تیروزین کیناز Tie2 (TEM) می‌باشند، توسط De Palma و همکاران در سال ۲۰۰۵ شناسایی شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که فنوتیپ ماکروفاژهای M2 بیشترین فعالیت رگ‌زایی در بین سلول‌های مشتق از مغز استخوان را دارند و با حذف Tie2 در TEM از رگ‌زایی تومور به طور کامل جلوگیری می‌شود. پذیرنده تیروزین کیناز Tie2 در ابتدا به عنوان پذیرنده اختصاصی عروق که هم در سلول‌های اندوتلیال طبیعی و هم توموری وجود دارد، گزارش شده است. مطالعات جدید نشان می‌دهند بیان پذیرنده Tie2 محدود به عروق خونی نمی‌شود و در انواع مختلفی از سلول‌های ریز محیط تومور، از جمله سلول‌های اندوتلیال، مونوسیت‌های بیان کننده Tie2، ماکروفاژهای مرتبط با تومور و پیش‌سازهای سلول‌های مورال عروق که همگی آن‌ها به طور اختصاصی در رگ‌زایی نقش دارند و یا می‌توانند مستقیماً در عروق خونی در حال تشکیل جای بگیرند بیان می‌شود (۲).

Tie2 به میزان کمی به وسیله بعضی از مونوسیت‌های خون محیطی بیان می‌شود و به محض لانه‌گزینی در تومورها، بیان آن به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد و به ماکروفاژهای اطراف عروقی تمایز می‌یابند. تخلیه تومورها از TEMs در موش سبب مهار آنژیوژنز تومور و رشد آن می‌شود، از آنجا که برخی از TEMs در مجاورت عروق خونی تومور در مناطق زنده تومور مستقر می‌شوند، می‌توان نتیجه گرفت که آن‌ها به شکل پاراکراین از عروق در حال تشکیل در این مناطق، طی فرایند رگ‌زایی حمایت می‌کنند (۲).

درک واکنش‌های پیچیده متقابل بین رده‌های سلولی مغز استخوان و رگ‌زایی تومور با توجه به توانایی انتقال برنامه‌های پروآنژیوژنیک توسط سلول‌های میلوئید نفوذکننده به تومور که می‌توانند فعالیت داروهای ضد رگ‌زایی را خنثی کنند از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. به نظر می‌رسد ماکروفاژها و مونوسیت‌های بیان کننده Tie2 در میان سلول‌های میلوئید، در افزایش رگ‌زایی و رشد تومور نقش پررنگ‌تری داشته باشند. شناخت خصوصیات و اعمال این سلول‌ها در موش و انسان اهداف مولکولی جدیدی را در درمان‌های ضد سرطان پدید می‌آورد. علاوه بر این، از این سلول‌ها جهت انتقال داروهای ضد تومور به ویژه در ریزمحیط تومور می‌توان استفاده کرد. از سوی دیگر، مطالعات مختلف نشان دهنده اهمیت مسیر سیگنالینگ Tie2-Ang2 در رشد و رگ‌زایی تومور است، به طوری که مهار مسیر سیگنالینگ Ang2 سبب مهار آنژیوژنز و القای تحلیل عروقی در چندین مدل تومور از جمله تومورهایی که به درمان ضد VEGF مقاوم می‌باشند، شده است و در سلول‌های TEMs نیز مانع افزایش بیان Tie2 که باعث ایجاد ارتباط این سلول‌ها با عروق خونی تومور و فعالیت رگ‌زایی آن‌ها می‌شود، گردید. هر چند که نقش مهار این مسیر در مطالعات مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است، اما فرایندهای مولکولی و اهمیت درمانی آن به عنوان یک هدف مولکولی هنوز مبهم مانده است. مهار فسفریلاسیون Tie2 با واسطه آنژیوپوپتین ۱ در شرایط آزمایشگاهی باعث کاهش زنده مانی و مهار رگ‌زایی و رشد تومور در شرایط بدن شد. سیستم آنژیوپوپتین-Tie2 نه تنها در فرایند رگ‌زایی و هموستاز عروقی ضروری است بلکه باعث ایجاد ارتباطات مهم بین مسیرهای آنژیوژنیک و مسیرهای التهابی می‌شود. در نتیجه این یافته‌ها اهمیت درک مکانیسم‌های مولکولی فعال‌سازی پذیرنده Tie2 در برهمکنش‌های سلول‌های اندوتلیال با ماکروفاژهای تومور و نیز درمان‌های ضد رگ‌زایی سرطان را ضروری می‌سازد (۳، ۴).

مواد و روش کار

در مطالعه حاضر جهت تهیه ماکروفاژهای مرتبط با تومور (TAM) سلول‌های لاین ماکروفاژ موش RAW 264.7 را در محیط رویی حاصل از سلول‌های سرطان 4T1 طی مراحل زیر کشت داده شد (۵، ۶).

کشت سلول 4T1 و تهیه محیط رویی: رده سلولی 4T1 که به عنوان سلول‌های سرطان پستان موش [American Type Culture Collection (ATCC) catalogue no. CRL-2539, 2004] شناخته می‌شوند، این تومور یک مدل حیوانی برای مرحله چهار سرطان پستان انسان است و از نوع سلول‌های اپیتلیال چسبنده می‌باشد. سلول‌ها در محیط RPMI-1640 با ۱۰ درصد سرم جنین گاو ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین کشت داده و در انکوباتور مرطوب ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO₂ نگهداری شدند. پس از آن که رشد سلول‌ها به ۸۰ تا ۹۰ درصد تراکم فلاسک رسید ۳ مرتبه با بافر PBS استریل شستشو داده و سپس محیط کشت RPMI-1640 بدون سرم اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه

سانتی‌گراد انکوبه شدند. محیط رویی تومور پس از جمع‌آوری با فیلتر پلاستیکی ۰/۲ میکرومتر فیلتر و جهت استفاده بعدی در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۵).

کشت سلول RAW 264.7: لاین سلول نیمه چسبنده لوکمی مونوسیت/ماکروفاژ موش RAW 264.7 در محیط کشت RPMI 1640- با ۱۰ درصد سرم جنین گاو ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور ۵ درصد CO₂ کشت داده شدند. پس از آن که با مشاهده میکروسکوپی، تراکم سلول‌های RAW 264.7 به ۵۰ درصد ظرفیت فلاسک رسید محیط رویی دور ریخته شد، فلاسک‌ها ۳ مرتبه با بافر سالین استریل شسته شده و محیط جدید RPMI 1640 به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاو و ۳۰ درصد از محیط رویی 4T1 اضافه و به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد (۵).

کشت سلول‌های ورید نافی انسان (HUVEC): جهت همکشتی سلول‌های اندوتلیال با سلول‌های ماکروفاژ و بررسی رفتار سلولی آن‌ها سلول‌های لاین اندوتلیال ورید ناف انسان HUVEC را در محیط کشت DMEM/F12 با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور ۵ درصد CO₂ کشت داده شدند.

ترانسفورماسیون پلاسمید نوترکیب: جهت ترانسفورماسیون پلاسمید نوترکیب cDNA ژن Tie2 در داخل وکتور به همراه جهش در جایگاه مربوطه (Y1100F, Y1106F, Y1111F) استفاده گردید (۷).

به منظور ترانسفکت سلول‌های RAW264.7 از کیت تجاری X-tremeGENE™HP DNA Transfection Reagent استفاده و تمام مراحل براساس پروتکل کیت انجام شد که به طور خلاصه شامل مراحل زیر است:

سلول‌ها از نظر تراکم و زنده بودن شمارش و ارزیابی گردید. تعداد 2×10^5 سلول در ۱ میلی‌لیتر محیط رشد کامل در هر چاهک پلیت ۶ خانه‌ای کشت داده شد. در روز ترانسفکشن تراکم سلولی باید ۸۰-۵۰ درصد باشد. سلول‌ها به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور ۵ درصد CO₂ انکوبه گردید.

محیط‌های قدیمی دور ریخته شده و محیط رشد کاملاً تازه جایگزین گردید. در ابتدا DNA پلاسمید و اجزای کیت را به دمای اتاق رسانده، ۰/۲ میکرولیتر (۰/۱ میکروگرم/میکرولیتر) DNA پلاسمید اضافه شد. با پیپت کردن آرام آرام مخلوط و سپس ۴ میکرولیتر معرف کیت به مخلوط DNA رقیق شده اضافه گردید. کمپلکس‌های DNA در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد و کمپلکس‌ها با اضافه کردن به صورت قطره‌ای در بین سلول‌ها توزیع شدند. به آرامی ظرف کشت را به عقب و جلو و از یک طرف به طرف دیگر تکان داده شد تا به طور مساوی توزیع شود. پس از ترانسفکشن به مدت ۷۲-۲۴ ساعت، سلول‌ها انکوبه شدند. محیط ترانسفکت، ۲۴ ساعت پس از ترانسفکت با محیط رشد کامل جایگزین گردید.

جداسازی سلول‌های Tie-2+ و Tie-2- از TAMs با استفاده از آنتی بادی‌های متصل به بید: وجود جمعیت‌های مختلف در یک رده سلولی را می‌توان با این روش از هم جدا نمود که اساس آن اتصال آنتی بادی‌های اولیه کونژوگه با بید به آنتی ژن‌های سطحی سلول‌ها می‌باشد. سلول‌های RAW ترانسفکت شده جدا و حدود ۲۰ میلیون سلول، برای جداسازی سلول‌های Tie-2+ و Tie-2- در نظر گرفته شد. سلول‌ها را در کنار یخ قرار داده و دو بار با بافر مکس شستشو داده شدند. سلول‌ها در ۵۰۰ میکرولیتر بافر مکس و در ستون مکس قرار داده شدند. ۰/۵ میکروگرم از آنتی بادی اولیه کونژوگه به بیوتین را به مدت ۳۰ دقیقه به سلول افزوده و در مرحله بعد، به مدت ۲۰ دقیقه آنتی بادی ثانویه استرپتاویدین متصل به بید اضافه شد. در پایان جمعیت‌های Tie-2+ و Tie-2- جدا شدند. جمعیت منفی طبق پروتکل کشت سلول‌های RAW کشت داده شده و برای اهداف دیگر مورد استفاده قرار گرفتند.

تشکیل تیوب: به منظور بررسی اثر فاکتورهای ترشح شده توسط ماکروفاژها پس از ترانسفکت بر روی رفتار سلول‌های اندوتلیال، یک سیستم همکشتی غیر تماسی با استفاده از پلیت مخصوص با غشاء منفذدار طراحی شد.

برای بررسی تشکیل لوله، ابتدا ماتریژل را در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ذوب و مقدار ۵۰ لاندا از آن را در کف پلیت ریخته و به مدت نیم ساعت در انکوباتور قرار داده شد. 1×10^4 سلول HUVEC به همراه ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM با ۱ درصد سرم جنین گاوی به گودی‌های حاوی ماتریژل اضافه و سپس بر روی سطح بالایی ماکروفاژهای ترانسفکت شده کشت گردید. پس از آن پلیت

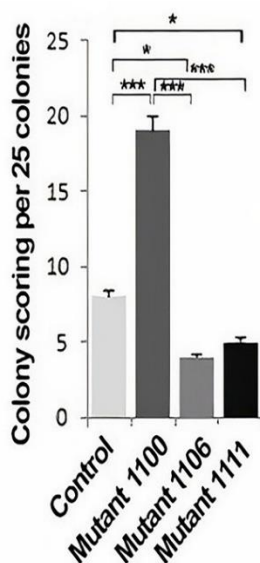
داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با رطوبت ۹۶ و ۵ درصد CO₂ قرار داده شد. برای هر آزمایش ۳ چاهک در نظر گرفته شد. بعد از گذشت ۱۸-۲۴ ساعت از هر چاهک توسط میکروسکوپ معکوس متصل به دستگاه تصویربرداری دیجیتالی عکس‌برداری و آنالیز انجام شد. آنالیز کمی آنژیوژنز از طریق بررسی ۲۵ کلونی در هر چاهک انجام گردید و امتیاز بین ۰ تا ۴ برای هر کلونی در نظر گرفته شد: ۱- تجمع سلولی بدون جوانه زدن، ۲- جوانه زدن بدون شاخه شدن، ۳- با آناستوموز و ۴- با تشکیل تیوب امتیاز نهایی هر چاهک با جمع زدن امتیاز ۲۵ کلونی و با احتساب حداکثر ۱۰۰ امتیاز محاسبه گردید. میانگین طول هر تیوب در ۵ زمینه میکروسکوپی با استفاده از نرم افزار image-analyzing software (Sight DS-L2; Nikon) بر حسب میکرومتر اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری تعامل فیزیکی سلول‌های اندوتلیال انسان با ماکروفاژها با استفاده از تشدید پلاسمون سطحی (SPR): از

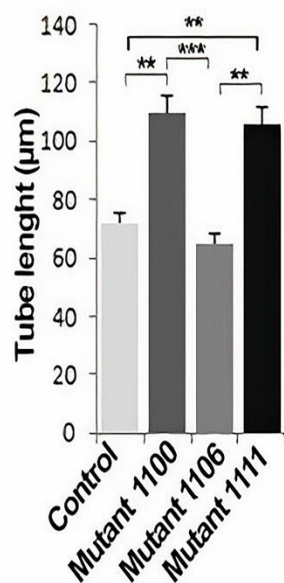
روش SPR برای ارزیابی نقش هر یک از جایگاه‌های پذیرنده Tie2 در اتصال فیزیکی بین ماکروفاژ و سلول اندوتلیال استفاده شد. برای ارزیابی اثر متقابل ماکروفاژها با گیرنده Tie2 جهش یافته با سلول‌های اندوتلیال، ۵۰۰ میکرومولار DMEM / HG حاوی ۵×۱۰^۵ سلول اندوتلیال وریدی ناف انسان (HUVECs) به آرامی روی سنسور طلای SPR قرار گرفتند و به سلول‌ها برای اتصال به سطح شیشه‌ای ۳۰ دقیقه زمان داده شد. شیشه‌ها درون پلیت کشت سلول قرار داده شدند و تا زمان رسیدن تراکم سلول‌های HUVEC به تک لایه سلولی، کشت داده شدند. به منظور تجزیه و تحلیل این که آیا اتصال HUVEC روی سطح طلا باعث تغییر در ضریب شکست می‌شود، هرگونه تغییر در منحنی SPR در بین شیشه‌های عاری از سلول و شیشه‌های دارای HUVEC با استفاده از دستگاه SPR چند پارامتری ثبت شد. سنسورهای طلای تازه در اسلایدهای نگه دارنده SPR قرار داده شدند. سپس تغییر زاویه SPR سنسور طلای فاقد سلول و سنسورهای مربوط به آن هنگام تزریق ماکروفاژها از گروه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. پس از آن، ۲×۱۰^۵ کنترل و ماکروفاژهای اصلاح شده در ۵۰۰ میکرولیتر PBS به حالت تعلیق در آمدند و به سطح طلای حاوی HUVECs در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه با سرعت جریان ۱۵ میکرولیتر در دقیقه تزریق شدند.

نتایج

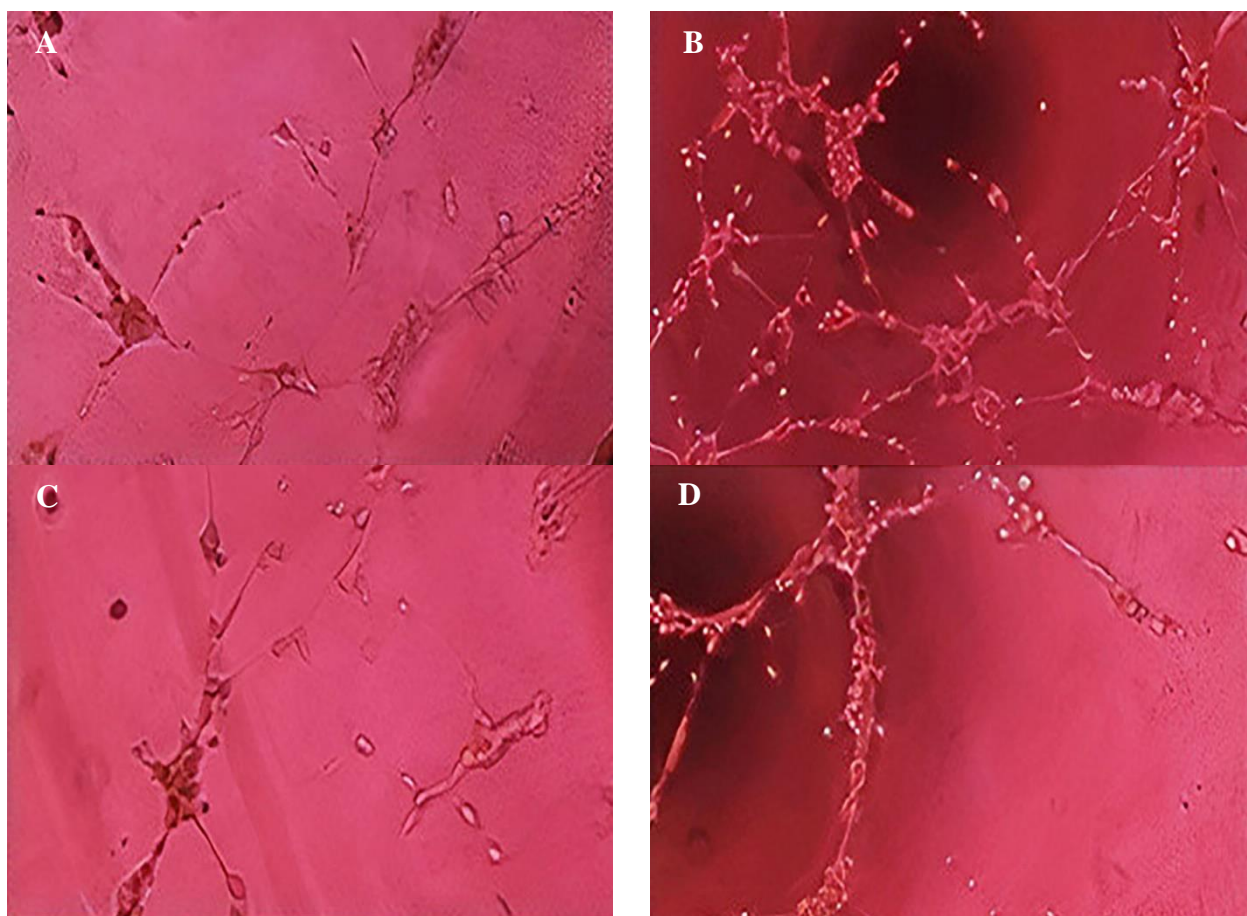
بررسی تشکیل تیوب بر روی ماتریژل به دنبال کشت سلول‌های Tie 2- القا شده با وکتور Tie 2 جهش یافته نشان داد که ساختار تیوب تحت القا با Tie 2 جهش یافته در جایگاه ۱۱۰۰ افزایش می‌یابد و از لحاظ آماری معنی‌دار بود (تصویر ۱B). این نتایج حاکی از نقش Tie 2 در القای رگ‌زایی در سلول‌های اندوتلیال به شکل غیرمستقیم است. در واقع جهش در جایگاه‌های ۱۱۰۶ و ۱۱۱۱ Tie2 سلول‌های TAM را به سمت سلول‌های ضد آنژیوژنیک سوق می‌دهد. موتاسیون جایگاه‌های ۱۱۰۶ و ۱۱۱۱ در Tie 2 به صورت معنی‌داری باعث کاهش میزان تشکیل تیوب در سیستم هم‌کشتی سلول‌های TAM با سلول‌های اندوتلیال تحت القا با وکتور جهش یافته Tie 2 شد (نمودار ۱).



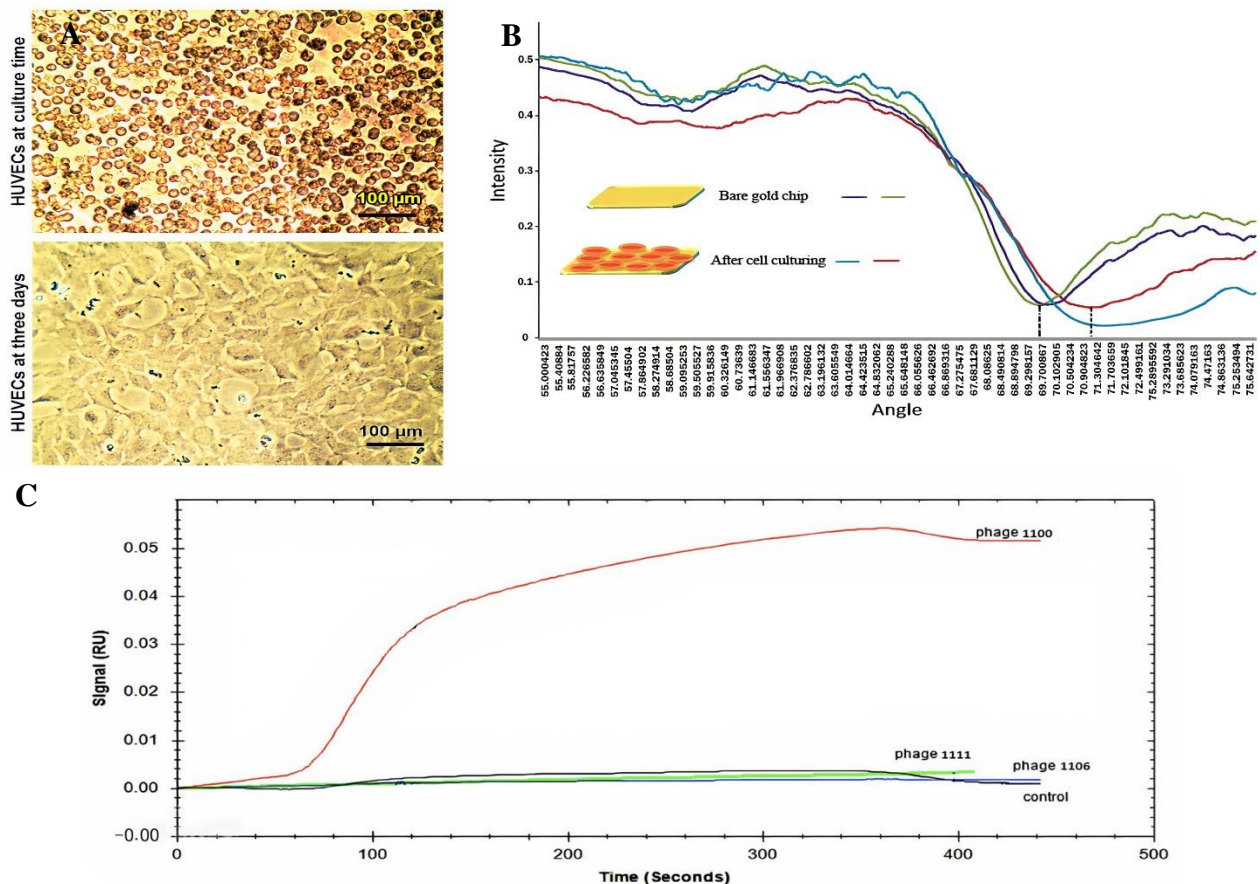
نمودار ۱. آنالیز کمی آنژیوژنز از طریق بررسی ۲۵ کلونی در هر چاهک.



نمودار ۲. میانگین طول هر تیوب در ۵ زمینه میکروسکوپی با استفاده از نرم افزار image-analyzing software (Sight DS-L2; Nikon) بر حسب میکرومتر. $P < 0.001$ ***, $P < 0.01$ **, $P < 0.05$ *.



تصویر ۱. بررسی تشکیل تیوب بر روی ماتریژل به دنبال کشت سلول‌های Tie 2^{-/-} (A) القا شده با وکتور (A): Tie 2 جهش یافته در تمام جایگاه‌ها (B): جهش یافته در جایگاه ۱۱۰۰ (C): جهش یافته در جایگاه ۱۱۰۶ (D): جهش یافته در جایگاه ۱۱۱۱.



تصویر ۲. (A) مراحل اندازه‌گیری تعامل فیزیکی سلول‌های اندوتلیال انسان با ماکروفاژها با استفاده از تشدید پلاسمون سطحی (SPR) کشت سلول‌های HUVEC بر روی قطعه طلا (B) منحنی SPR از قطعات طلا پیش و پس از کشت سلول (C) سنسوگرام ماکروفاژهای با جهش‌های مختلف جایگاه‌های Tie 2 بر روی تک لایه سلول‌های HUVEC

عکس‌برداری با میکروسکوپ زمینه روشن از تراشه‌های طلای SPR نشان داد که سلول‌های HUVEC در زمان کشت به طور یکنواخت روی سطح شیشه پخش می‌شوند (شکل سلول‌ها پس از سه روز به طور مناسب روی سطح هدف رشد و گسترش یافته و یک لایه منفرد سلولی را تشکیل دادند (تصویر 2A)). تغییر زاویه پایه از $69/70^\circ$ به $71/30^\circ$ درجه چسبندگی و بی‌حرکتی HUVECs روی سطح تراشه را تأیید کرد. با توجه به تشکیل تک لایه سلولی روی سطح طلا، سیگنال SPR تغییر در ضریب شکست در نزدیکی سطح پوشیده شده با سلول‌های HUVEC را نسبت به سطح فاقد سلول نشان داد. سنسورهای SPR نشان دادند، ماکروفاژهای گروه 1100 ظرفیت اتصال بیشتری به HUVECs نسبت به سایر گروه‌ها دارند. بر اساس داده‌ها، مقادیر واحد پاسخ (RU) به دست آمده برای اتصال گروه 1100 نزدیک به 4×10^{-4} RU بود در حالی که مقدار RU مربوط به سایر گروه‌ها و گروه کنترل نزدیک 4×10^{-4} RU بود. هیچ تفاوتی در تعامل ماکروفاژ و HUVEC در گروه‌های کنترل، 1101، 1106 مشاهده نشد (تصویر 2B). این نتایج نشان می‌دهد می‌توان با جهش در جایگاه خاصی از پذیرنده Tie2 برهم کنش و تمایل ماکروفاژها با سلول‌های اندوتلیال عروقی را کنترل کرد که در ارتقاء و کنترل پاسخ‌های التهابی در بافت هدف، مؤثر است.

بحث

اکنون کاملاً پذیرفته شده است که رشد و گسترش تومورهای بدخیم نیاز به رگ‌زایی دارد، فرایندی که از طریق آن عروق خونی جدید از عروق موجود جوانه می‌زند. Shirakawa و همکاران در سال 2002 با استفاده از واکنش نیمه کمی PCR معکوس نشان دادند که فاکتورهای آنژیوژنیک و نه فاکتورهای لمفانژیوژنیک در سرطان پستان التهابی (IBC)، که نوعی از سرطان پستان است که علی‌رغم پیشرفت‌های اخیر در درمان پیش‌آگهی ضعیفی دارد، در مقایسه با تومورهای غیر التهابی افزایش پیدا کرده است. آنالیز ایمونوهیستوشیمی نمونه‌ها افزایش قابل توجه جمعیت سلول‌های اندوتلیال نفوذ کننده به تومور و سلول‌های پیش ساز اندوتلیال (EPC) در استرومای نمونه‌های IBC در مقایسه با نمونه‌های غیر IBC

را نشان داد، تومورها صرفاً از سلول‌های سرطانی تشکیل نشده‌اند (۸). ریز محیط تومور که تشکیل شده از سلول‌های استرومایی (بخش سلولی) و اجزای ماتریکس خارج سلولی (ECM) (بخش غیر سلولی) نقش مهمی در پیشرفت و تهاجم تومور بازی می‌کند (۹). اخیراً مشخص شده مقاومت یا بازگشت تومور پس از درمان باعث القای خروج سلول‌های میلوئید از مغز استخوان می‌شود. زمانی که سلول‌های میلوئید وارد تومور می‌شوند با آزاد کردن فاکتورهای رگ‌زا و tissue-remodeling سبب پیشرفت رگ‌زایی و هم چنین باعث تحریک سلول‌های تومور برای ورود به درون عروق خونی، توزیع و متاستاز آن‌ها می‌شوند. سلول‌های مختلف ایمنی وارد ریز محیط تومور می‌شوند و اعمال ضد توموری آن‌ها تا حد زیادی در پاسخ به سیگنال‌های مشتق شده از تومور کاهش می‌یابد. سلول‌های ایمنی در ریز محیط تومور نه تنها توانایی انجام اعمال ضد توموری مؤثر ندارند، بلکه در تقویت رشد تومور همکاری می‌کنند. فرار تومور از سیستم ایمنی از طریق فعال‌سازی یک یا چند مکانیسم مولکولی که منجر به مهار عملکرد سلول‌های ایمنی یا آپوپتوز سلول‌های ضد تومور می‌شود انجام می‌گیرد (۱۰).

ماکروفاژها معمولاً فراوان‌ترین جمعیت ایمنی موجود در ریز محیط تومور می‌باشند (۱۱). این احتمال که ماکروفاژها قادر به تعدیل رگ‌زایی باشند، برای اولین بار توسط Sunderkotter و همکاران در سال ۱۹۹۱ ارائه شد. از آن زمان تاکنون برای ارائه تصویری دقیق از مکانیسم‌های احتمالی مورد استفاده ماکروفاژها برای تنظیم آنژیوژنز در تومورها، توضیحات زیادی ارائه شده است. De Palma و همکاران در سال ۲۰۰۵ در تومورهای پستانی N202 زیر جلدی موش بیان Tie 2 را در سه نوع سلول مجزا: ECs، سلول‌های پروآنژیوژنیک با منشأ هماتوپوئیتیک و پیش‌سازهای پری سیت با منشأ مزانشیمال را شناسایی کردند. آن‌ها نشان دادند که مونوسیت‌های بیان کننده Tie2 (TEMs) یک رده هماتوپوئیتیک مجزا از سلول‌های ضد آنژیوژنیک می‌باشند که به طور انتخابی وارد تومورهای خود به خودی و orthotopic می‌شوند و رگ‌زایی را به شکل پاراکراین افزایش می‌دهند و بیشترین فعالیت رگ‌زایی را در میان سلول‌های میلوئید تومور دارند. TEM knockout کاملاً از نوع عروق‌زایی در تومور گلیوما انسان در مغز موش جلوگیری کرد و متعاقباً باعث تحلیل تومور شد (۱۲). Liu و همکاران در سال ۲۰۱۰ با استفاده از RNA کوچک مداخله کننده اختصاصی (siRNA) بیان Tie2 را knockdown کردند که باعث مهار توانایی چسبیدن سلول‌های گلیوما به سلول‌های اندوتلیال شد. فعال شدن Tie2 سبب القای افزایش بیان اینترگرین $\beta 1$ و N-کاده‌رین گردید و آنتی بادی‌های خنثی کننده علیه این مولکول‌ها باعث مهار چسبیدن سلول‌های Tie2 مثبت به سلول‌های اندوتلیال شد. در کشت‌های ۲ بعدی و ۳ بعدی فعال‌سازی محور Ang1/Tie 2 با افزایش تهاجم سلول‌های گلیوما مرتبط بود که این فرایند با استفاده از Tie2 siRNA مهار شد. کاشت همزمان سلول‌های گلیوما Tie2 مثبت همراه با سلول‌های اندوتلیال در موش‌های مدل آزمایشگاهی منجر به ایجاد تومورهای با تهاجم منتشر همراه با کلاسترهای سلولی که عروق شبه گلوومولوئید را احاطه کرده بودند؛ شد که توزیع نیش تومور را تقلید می‌کردند. نتایج این مطالعه نشان دهنده نقش مسیر سیگنالینگ Tie2 در کنش متقابل سلول‌های گلیوما با ریز محیط تومور است (۱۳).

ماکروفاژها مقادیر فراوانی از اگزوزوم‌ها و سایر میکرووزیکول‌ها را در شرایط آزمایشگاهی آزاد می‌کنند (۱۴، ۱۵). در برخی از مطالعات مشخص شد، میکرووزیکول‌های مشتق از ماکروفاژ حاوی میکرو RNAها (miRNA) می‌باشند که ممکن است به سلول‌های پذیرنده منتقل شوند به عنوان مثال، Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند مونوسیت‌های THP1 لوسمیک انسان، اگزوزوم‌های غنی از miR-150 را ترشح می‌کنند. جالب این که، اگزوزوم‌های مشتق شده از THP1 با ECهای لاین HMEC1 انسان جوش می‌خورند و سطح miR-150 اندوزن آن‌ها را چندین برابر افزایش می‌دهند. اگرچه نحوه دقیق انتقال miRNA فعال از مونوسیت‌ها به ECها به مطالعات بیشتری نیاز دارد، اما Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۰ شواهدی اساسی مبنی بر وجود اگزوزوم‌های مشتق شده از ماکروفاژها برای تأثیر بر رفتار EC در شرایط *in vitro* را نشان دادند. در حقیقت، اگزوزوم‌های تخلیص شده از مونوسیت‌های THP1 می‌توانند مهاجرت سلول‌های HMEC1 را در روش transwell assay افزایش دهند (۱۴).

این یافته‌ها نشان می‌دهد، ماکروفاژهای اطراف عروقی ممکن است اگزوزوم‌های غنی از پروتئین‌های خاص یا RNA ترشح کنند، که به نوبه خود می‌توانند بیان ژن و عملکرد ECهای مربوط به آنژیوژنز را تنظیم کنند.

نکته قابل توجه، رگ‌زایی عروق خونی و توموری به طور خاص، با عروق در حالت سکون فرق می‌کند. سلول‌های مورال در لابه‌های اطراف اندوتلیالی عروق (پری‌سیت‌ها و سلول‌های عضلات صاف) و یکپارچگی غشاءهای پایه اندوتلیال اغلب در طی رگ‌زایی از هم گسیخته می‌شوند تا EC بتواند مهاجرت و رشد کند (۱۵، ۱۶). بر اساس این تغییرات میکروآناتومیک می‌توان تصور کرد، ماکروفاژهای

اطراف عروقی در طی رگ‌زایی می‌توانند از طریق ترشح میکرووزیکول‌ها و انتقال آن به ECها، بر بیولوژی و الگوی عروقی تأثیر بگذارند. در حال حاضر برای درک اهمیت این پدیده در رگ‌زایی در داخل بدن مطالعات بیشتری مورد نیاز است.

موارد بالا نشان می‌دهد، فعالیت پروآنژیوژنیک ماکروفاژها (یا زیرمجموعه‌های خاص از این سلول‌ها) هم شامل تولید فاکتورهای پروآنژیوژنیک کلاسیک می‌شود و هم ارتباط فیزیکی ماکروفاژها با رگ‌های خونی در حال جوانه زدن می‌شود. در حالت ارتباط فیزیکی نیاز به تعامل مستقیم ECها با ماکروفاژها M2 است، فرایندی که به نظر می‌رسد، حداقل در بخشی، توسط محورهای سیگنالینگ Ang2 / Tie2 و CXCL12 / CXCR4 تنظیم می‌شود (۱۷، ۱۸) مطالعات جدیدتر نشان می‌دهد، فعل و انفعالات ماکروفاژ-EC در واقع دو طرفه است، زیرا مطالعات هم‌کشتی آزمایشگاهی نشان داد، تک‌لایه‌های EC می‌تواند از تمایز این ماکروفاژهای شبه M2 از پیش‌سازهای میلوئیدی پشتیبانی کند زیرا این سلول‌ها (یا پیش‌سازهای آن‌ها) از رگ خارج شده و در دیواره رگ اقامت می‌کنند (۱۹).

در این مطالعه با هدف بررسی نقش هر یک از جایگاه‌های فسفریلاسیون پذیرنده Tie2 در اتصال فیزیکی ماکروفاژها به سلول‌های اندوتلیال و نیز در برهمکنش غیر مستقیم آن‌ها در رگ‌زایی از یکسری از وکتورهای با Tie2 جهش‌یافته استفاده شده که پس از ترانسفکت ماکروفاژهای مشتق از تومور با این وکتورهای جهش‌یافته با استفاده از روش SPR اتصال فیزیکی بررسی شده است.

ماکروفاژها علاوه بر تولید فاکتورهای رشد متعارف در رگ‌زایی، ممکن است رگ‌زایی را با ترشح MV، مانند آگزوزوم‌ها نیز تحریک کنند (۲۰). بنابراین با طراحی یک مدل هم‌کشتی غیر تماسی با استفاده از پلیت‌های اینزرت دارای غشاء منفذدار اثر این پذیرنده بر فاکتورهای مترشحه احتمالی از ماکروفاژها و تأثیر آن بر روی آنژیوژنز و رفتار سلول‌های اندوتلیال، ارزیابی شده است.

جهت تهیه TAM از محیط رویی تومور 4T1 استفاده شده است نتایج حاصل از فلوسیتومتری نشان‌دهنده افزایش MRC1 به عنوان شاخص فنوتیپ ماکروفاژهای M2 بود که این یافته با داده‌های حاصل از مطالعه Benner و همکاران در سال ۲۰۱۹ و نیز Houck و همکاران در سال ۲۰۱۹ مطابقت داشت که نشان دهنده اهمیت سیگنال‌های موجود در ریزمحیط تومور در تغییر فنوتیپ و رفتار سلول‌های التهابی به سمت حمایت از تومور است (۶، ۲۱).

تعداد زیادی از مطالعات تا کنون نشان می‌دهند، ماکروفاژهای اطراف عروق بیولوژی ECها را در طی رگ‌زایی و بازسازی عروق تنظیم می‌کنند. نتایج به دست آمده از SPR نشان می‌دهد، تیروزین جایگاه ۱۱۰۰ بر اتصال ماکروفاژهای Tie2 به سلول‌های اندوتلیال بی‌اثر است و یا اثر ممانعتی دارد به طوری که در گروه با جهش در این جایگاه اتصال فیزیکی بیشتر بود و نیز رگ‌زایی بهتر انجام گرفت و بنابراین نشان دهنده اهمیت جایگاه‌های ۱۱۰۶ و ۱۱۱۱ در اتصال فیزیکی ماکروفاژها به سلول‌های اندوتلیال و القای آنژیوژنز است. همچنین این نتایج نشان‌دهنده اهمیت اتصالات فیزیکی ماکروفاژها در القای آنژیوژنز به صورت پاراکراین می‌باشد.

Siavashi و همکاران در سال ۲۰۱۹ با استفاده از موتاسیون‌های Tie2 در سلول‌های EPC و بررسی رفتار ایجاد تیوب و مهاجرت آن‌ها بر روی ماتریکل نشان دادند که موتاسیون در جایگاه ۱۱۰۶ پذیرنده Tie2 این سلول‌ها را به سمت فنوتیپ سلول‌های اندوتلیال بالغ می‌برد و تیروزین ۱۱۰۶ نقش مهمی در حفظ ویژگی‌های EPC به عنوان سلول‌های بنیادی دارد (۲۲) که با نتایج مطالعه حاضر مغایرت داشت. از طرف دیگر، تا کنون مطالعات زیادی در مورد منشأ TAMها انجام شده و هر چند که معمولاً مونوسیت‌ها به عنوان پیش‌سازهای TAM توصیف می‌شوند، هنوز مشخص نیست که کدام یک از دو جمعیت اصلی مونوسیت‌های در گردش خون، مونوسیت‌های التهابی Ly6C⁺ یا رزیدنت Ly6C⁻ "منبع اصلی TAM در موش‌ها است (۲۳، ۲۴). محققینی چون Asahara و همکاران در سال ۱۹۹۷ منشأ مشترکی را با سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال (EPC) فرض می‌کنند زیرا EPCهای هماتوپوئیتیک و در گردش خون از مغز استخوان (BM) منشأ می‌گیرند و توانایی تمایز به سلول اندوتلیال و شرکت در رگ‌زایی خونی و لنفاوی را دارند (۲۵). نقش EPC در عروق تومورهای موش برای اولین بار توسط Lyden و همکاران در سال ۲۰۰۱ اعلام شد، که گزارش دادند پیوند سلول‌های بنیادی نوع وحشی مغز استخوان به موش‌های دارای نقص رگ‌زایی توانست رشد تومور و آنژیوژنز را بازبانی کند (۲۶). EPCهای عروق خونی و لنفاوی در انسان از پروژنیاتورهای CD34⁺ مغز استخوان منشأ می‌گیرند و دارای مارکرهای اختصاصی سلول‌های اندوتلیال بالغ مانند Tie-1، Tie-2، VEGFR-2، VEGFR-3 یا کادهرین اندوتلیال عروقی می‌باشند (۲۷). اخیراً، گزارش شده EPC، CD34⁺ CD133⁺ توانایی تمایز به سلول‌های اندوتلیال لنفاوی میلوئیدی (LEC) بیان کننده VEGF-A، C و D را در شرایط آزمایشگاهی دارند که به طور مداوم

فعالیت‌های همانژیوژنیک و لنفاژوژنیک را نشان می‌دهد (۲۸). سرانجام و از همه مهم‌تر، سلول‌های میلوئیدی LEC در شرایط آزمایشگاهی در حضور پلاسمای بیمار تمایز می‌یابند و هم فنوتیپ و هم اعمال آنژیوژنیک TEM‌های تومورهای پستانی را نشان می‌دهند (۲۸). در حالی که نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان دهنده نقش و عمل متفاوت پذیرنده Tie2 در این دو نوع سلول است از این رو، ارتباط نسبی EPC با مونوسیت‌های آنژیوژنیک یا TEM و همچنین میزان سهم آن‌ها در نئوواسکولاریزاسیون سرطان‌های انسانی نیاز به مطالعات بیشتری دارد. Jones و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند، به طور کلی جایگاه تیروزین ۱۱۰۶ Tie2 به عنوان جایگاه فسفریلاسیون وابسته به Ang1 است و باعث فعال شدن پروتئین‌های وابسته به تیروزین کیناز (DOK-R) می‌شود. در حالی که جایگاه ۱۱۰۰ و ۱۱۱۱ در انتهای دم کربوکسیل پذیرنده قرار دارد و به ناحیه Src homology 2 (SH2) زیر واحد P58 از اینوزیتول تری کیناز (PI3K) متصل و فسفریله می‌شود و مسیرهای سیگنالینگ پایین دست از جمله AKT را فعال می‌کند و باعث مهاجرت سلول‌های اندوتلیال و بقای آن‌ها می‌شود. نتایج مطالعات نشان می‌دهد فعال شدن PI3K و AKT در بخش‌هایی از Tie2 در تکوین عروق جنین و رگ‌زایی پاتولوژیکی نقش دارد که با نقش Tie2 در بقای سلول‌های اندوتلیال سازگاری دارد (۷).

نتیجه‌گیری نهایی: سیستم آنژیوپوئیتین-Tie2 نه تنها در فرایند رگ‌زایی و هموستاز عروقی ضروری است بلکه باعث ایجاد ارتباطات مهم بین مسیرهای آنژیوژنیک و مسیرهای التهابی می‌شود (۳، ۴). نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده نقش مسیر سیگنالینگ Tie2 در کنش متقابل سلول‌های ماکروفاژ با سلول‌های اندوتلیال هم به صورت مستقیم به شکل ارتباط فیزیکی و هم غیرمستقیم از طریق ترشح فاکتورهای مؤثر بر رگ‌زایی می‌باشد. به علاوه مطالعه حاضر نشان داد اعمال هر یک از جایگاه‌های فسفریلاسیون این پذیرنده و مسیرهای پایین دست آن در سلول‌های اندوتلیال و EPC در مقایسه با ماکروفاژهای مشتق شده از تومور متفاوت است که هنوز مشخص نیست این تغییر بسته به شرایط محیطی و وجود فاکتورهای مختلف تغییر می‌کند یا خیر؟ در نتیجه این یافته‌ها اهمیت درک مکانیسم‌های مولکولی فعال‌سازی پذیرنده Tie2 در برهمکنش‌های سلول‌های اندوتلیال با ماکروفاژهای تومور و نیز درمان‌های ضد رگ‌زایی سرطان را ضروری می‌سازد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بر خود واجب می‌دانند از مسئولین آزمایشگاه دکتر رستگار، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران برای تأمین تجهیزات مورد نیاز مطالعه حاضر و همچنین از دکتر رضا رهبر قاضی و دکتر وحید سیاوشی به پاس محبت و مساعدت‌های فراوانی که در انجام مراحل مختلف این مطالعه داشتند، تشکر و قدردانی کنند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995;1(1):27-31. [doi: 10.1038/nm0195-27](https://doi.org/10.1038/nm0195-27) PMID: 7584949
2. De Palma M, Venneri MA, Galli R, Sergi LS, Politi LS, Sampaolesi M, et al. Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proAngiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell.* 2005;8(3):211-226. [doi: 10.1016/j.ccr.2005.08.002](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.08.002) PMID: 16169466
3. Daly C, Eichten A, Castanaro C, Pasnikowski E, Adler A, Lalani AS, et al. Angiopoietin-2 functions as a Tie2 agonist in tumor models, where it limits the effects of VEGF inhibition, *Cancer Res.* 2013;73(1):108-18. [doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2064](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2064) PMID: 23149917
4. Hayes AJ, Li LY, Lippman ME. Anti-vascular therapy: a new approach to cancer treatment. *West J Med.* 2000;172(1):39-42. [doi: 10.1136/ewjm.172.1.39](https://doi.org/10.1136/ewjm.172.1.39) PMID: 18751215
5. Deng R, Wang SM, Yin T, Ye TH, Shen GB, Li L, et al. Dimethyl sulfoxide suppresses mouse 4T1 breast cancer growth by modulating tumor-associated macrophage differentiation. *J Breast Cancer.* 2014;17(1):25-32. [doi: 10.4048/jbc.2014.17.1.25](https://doi.org/10.4048/jbc.2014.17.1.25) PMID: 24744794

6. Benner B, Scarberry L, Suarez-Kelly LP, Duggan MC, Campbell AR, Smith E, et al. Carson WE 3rd. Generation of monocyte-derived tumor-associated macrophages using tumor-conditioned media provides a novel method to study tumor-associated macrophages in vitro. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):140. doi: [10.1186/s40425-019-0622-0](https://doi.org/10.1186/s40425-019-0622-0) PMID: [31138333](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31138333/)
7. Jones N, Chen SH, Sturk C, Master Z, Tran J, Kerbel RS, et al. A unique autophosphorylation site on Tie2/Tek mediates Dok-R phosphotyrosine binding domain binding and function. *Mol Cell Biol*. 2003;23(8):2658-2668. doi: [10.1128/MCB.23.8.2658-2668.2003](https://doi.org/10.1128/MCB.23.8.2658-2668.2003) PMID: [12665569](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12665569/)
8. Shirakawa K, Shibuya M, Heike Y, Takashima S, Watanabe I, Konishi F, et al. Tumor-infiltrating endothelial cells and endothelial precursor cells in inflammatory breast cancer. *Int J Cancer*. 2002;99:344-351. doi: [10.1002/ijc.10336](https://doi.org/10.1002/ijc.10336) PMID: [11992402](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11992402/)
9. Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*. 2008;27(45):5904-12. doi: [10.1038/onc.2008.271](https://doi.org/10.1038/onc.2008.271) PMID: [18836471](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18836471/)
10. Baghban R, Roshangar L, Jahanban-Esfahlan R, Seidi K, Ebrahimi-Kalan A, Jaymand M, et al. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Commun Signal*. 2020;18:1-19. doi: [10.1186/s12964-020-0530-4](https://doi.org/10.1186/s12964-020-0530-4) PMID: [32264958](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32264958/)
11. Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008;66(1):1-9. doi: [10.1016/j.critrevonc.2007.07.004](https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2007.07.004) PMID: [17913510](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17913510/)
12. Sunderkotter C, Goebeler M, Schulze-Osthoff K. Macrophage-derived angiogenesis factors. *Pharmacol Ther*. 1991;51(2):195-216. doi: [10.1016/0163-7258\(91\)90077-y](https://doi.org/10.1016/0163-7258(91)90077-y) PMID: [1784630](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1784630/)
13. Liu D, Martin V, Fueyo J, Lee OH, Xu J, Cortes-Santiago N, et al. Tie2/TEK modulates the interaction of glioma and brain tumor stem cells with endothelial cells and promotes an invasive phenotype. *Oncotarget*. 2010;1(8):700. doi: [10.18632/oncotarget.101204](https://doi.org/10.18632/oncotarget.101204) PMID: [21321379](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21321379/)
14. Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, et al. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell*. 2010;39(1):133-44. doi: [10.1016/j.molcel.2010.06.010](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.010) PMID: [20603081](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20603081/)
15. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. 2011;146(6):873-87. doi: [10.1016/j.cell.2011.08.039](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.039) PMID: [21925313](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21925313/)
16. Weis SM, Cheresh DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med*. 2011;17(11):1359-1370. doi: [10.1038/nm.2537](https://doi.org/10.1038/nm.2537) PMID: [22064426](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22064426/)
17. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Yung S, et al. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell*. 2006;124(1):175-89. doi: [10.1016/j.cell.2005.10.036](https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.036) PMID: [16413490](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16413490/)
18. Mazziari R, Pucci F, Moi D, Zonari E, Ranghetti A, Berti A, et al. Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells. *Cancer Cell*. 2011;19(4):512-26. doi: [10.1016/j.ccr.2011.02.005](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.02.005) PMID: [21481792](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21481792/)
19. He H, Xu J, Warren CM, Duan D, Li X, Wu L, Iruela-Arispe ML. Endothelial cells provide an instructive niche for the differentiation and functional polarization of M2-like macrophages. *Blood*. 2012;120(15):3152-62. doi: [10.1182/blood-2012-04-422758](https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-422758) PMID: [22919031](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22919031/)
20. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(8):569-79. doi: [10.1038/nri855](https://doi.org/10.1038/nri855) PMID: [12154376](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12154376/)
21. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara NJ. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem*. 1992;267(36):26031-26037. PMID: [1464614](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1464614/)
22. Siavashi V, Nassiri SM, Rahbarghazi R, Mohseni Z, Sharifi AM. Distinct Tie2 tyrosine phosphorylation sites dictate phenotypic switching in endothelial progenitor cells. *J Cell Physiol*. 2019;234(5):6209-6219. doi: [10.1002/jcp.27349](https://doi.org/10.1002/jcp.27349) PMID: [30246247](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30246247/)
23. Movahedi K, Laoui D, Gysemans C, Baeten M, Stangé G, Van den Bossche J, et al. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C (high) monocytes origin and functions of tumor macrophage subsets. *Cancer Res*. 2010;70(14):5728-5739. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-09-4672](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4672) PMID: [20570887](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20570887/)
24. MacDonald KP, Palmer JS, Cronau S, Seppanen E, Olver S, Raffelt NC, et al. An antibody against the colony-stimulating factor 1 receptor depletes the resident subset of monocytes and tissue- and tumor-associated macrophages but does not inhibit inflammation. *Blood*. 2010;116(19):3955-3963. doi: [10.1182/blood-2010-02-266296](https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-266296) PMID: [20682855](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20682855/)
25. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275(5302):964-966. doi: [10.1126/science.275.5302.964](https://doi.org/10.1126/science.275.5302.964) PMID: [9020076](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9020076/)

26. Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nature Medicine*. 2001;7(11):1194-201. [doi: 10.1038/nm1101-1194](https://doi.org/10.1038/nm1101-1194) PMID: 11689883
27. Resch T, Pircher A, Kähler CM, Pratschke J, Hilbe W. Endothelial progenitor cells: current issues on characterization and challenging clinical applications. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2012;8:926-939. [doi: 10.1007/s12015-011-9332-9](https://doi.org/10.1007/s12015-011-9332-9) PMID: 22095429
28. Bron S, Henry L, Faes-Van't Hull E, Turrini R, Vanhecke D, Guex N, et al. TIE-2-expressing monocytes are lymphangiogenic and associate specifically with lymphatics of human breast cancer. *Oncoimmunology*. 2016;5(2):e1073882. [doi: 10.1080/2162402X.2015.1073882](https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1073882) PMID: 27057438