

· 论 著 ·

肿瘤源性血管内皮细胞的培养及其细胞生物学特性鉴定*

蒋 力, 何 勇, 蒋耀光[△]

(第三军医大学大坪医院胸心外科中心, 重庆 400042)

摘要:目的 探讨肿瘤来源血管内皮细胞的诱导和体外培养方法, 并对其进行细胞生物学特性鉴定。方法 胰蛋白酶灌流消化法收集人脐静脉内皮细胞(HUVEC), 采用肿瘤细胞的培养上清液诱导 HUVEC 增殖, 制备肿瘤衍生的血管内皮细胞(Td-EC)。采用形态学观察和荧光染色Ⅷ因子相关抗原, 鉴定血管内皮细胞, 用 RT-PCR 检测肿瘤血管内皮细胞标志物(TEM)的表达, 采用迁徙试验、透射电镜、流式细胞仪细胞周期分析等方法检测、比较 HUVEC 和 Td-EC 的生物学特性。结果 原代培养的 HUVEC 约于 24h 完全贴壁, 4~5d 后融合成单层铺路石样结构。Ⅷ因子荧光染色证实培养的细胞是 HUVEC。经肿瘤细胞上清液诱导后, 用 RT-PCR 检测到 TEM1 和 TEM8 mRNA 在 Td-EC 中的表达; Td-EC 细胞迁徙能力较 HUVEC 显著增强; Td-EC 细胞增生活跃, G₀~S 期细胞比例明显增高, 具有肿瘤血管内皮细胞特性。结论 胰蛋白酶灌流消化法可获得大量连续传代扩增的 HUVEC, 并可诱导生成肿瘤源性的血管内皮细胞。

关键词:人脐静脉内皮细胞; 肿瘤内皮抗原; Ⅷ因子; 细胞迁徙

中图分类号: R730.23

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2009)24-3102-03

Culture and cell biological characteristics of tumor-derived endothelial cells*

JIANG Li, HE Yong, JIANG Yao-guang[△]

(Thoracic Surgery Center of People's Liberation Army, Daping Hospital, Research Institute of Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To research tumor-derived endothelial cells(Td-EC) induced by the source of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in vitro methods, and to identify its cell biological characteristics. **Methods** We cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and differentiated them into Td-ECs after co-cultured with supernatants of A549 cells, and identified HUVEC with observation and fluorescence staining Ⅷ-related antigen, examined its cell biological characteristics in vitro with the cell migration assay, transmission electron microscopy (TEM) and flow cytometry assay. **Results** The primary culture cells from human umbilical vein were observed completely wall stucked in 24h, 4~5d later, they fused like some structure of monolayer flagstone, and the Ⅷ factor associated antigens' fluorescence staining confirmed that the cultured cells were endothelial cells. After the cells were induced by culture supernatants of A549 cells, we could detect the mRNA of TEM1 and TEM8 in the Td-Ec with RT-PCR. Td-EC had more active cellular proliferation and cell migration capacity, G₀/G₁ and S phase proportion of Td-Ec was higher than HUVEC, so, these cells had some characteristics of Td-Ec. **Conclusion** This study reveals a method to get substantial endothelial cells, which could induce Td-Ec.

Key words: HUVEC; transmission electron microscopy; Ⅷ factor; cell migration

肿瘤血管是肿瘤形成、生长及转移的基础, 破坏少量的肿瘤血管即可导致大片区域的肿瘤细胞缺血坏死, 因而特异性杀伤肿瘤血管内皮细胞已成为肿瘤治疗的重要策略之一^[1-2]。肿瘤血管的内皮细胞在形态、结构及功能上与正常血管的内皮细胞有质的不同, 前者可表达其特有的抗原分子, 如: 肿瘤内皮标志物(TEM)、VEGF 受体等^[3], 这使得研究针对肿瘤血管内皮细胞的特异性杀伤成为可能, 并为抗肿瘤的免疫治疗提供了一种新的方法。为此作者建立了体外培养人脐静脉内皮细胞(HUVEC)诱导肿瘤来源血管内皮细胞(Td-EC)的方法, 并对培养的 Td-EC 进行了鉴定, 以期建立诱导细胞特异性的肿瘤内皮细胞杀伤效应工作打下基础。

1 材料与方

1.1 试验材料 脐带: 健康足月剖宫产胎儿新鲜脐带(取自第三军医大学附属第一医院产科), 孕妇产前检查 HBsAg、衣原体、人免疫缺陷病毒及梅毒均阴性, 取材在无菌操作下完成; 人肺腺癌 A549 细胞株由西南医院熊刚博士惠赠。

1.2 试验试剂 PRMI1640 培养基、优级胎牛血清、人内皮细胞无血清培养基(HESFM)、胰蛋白酶粉购自美国 Hyclone 公司, ECGF、RNA 提取试剂盒(Takara catrimox214TM RNA isolation kit)及 RT-PCR 试剂盒(Takara BcaBESTTM RNA PCR Kit)购自宝生生物工程有限公司, ECM550 transwell 小室(Chemicon 公司)、兔抗人Ⅷ因子抗体血清、羊抗兔免疫荧光抗体, 购自武汉博士德生物公司, 引物合成于上海生物有限公司。

1.3 主要实验仪器 Model 2300 CO₂ 培养箱(美国 SHEL-LAB 公司), 倒置相差显微镜、倒置荧光显微镜(德国徕卡公司)。

1.4 HUVEC 的分离培养 取健康、足月剖宫产胎儿脐带 20~30cm, 在超净工作台中用 37℃ 无菌磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗干净, 剪除脐带中钳痕和凝血块阻塞部分; 在脐静脉一端插入钝头 10# 注射器针头, 并以血管钳固定, 用注射器吸取 PBS 冲洗脐静脉腔, 直至静脉内无血。血管钳夹闭脐静脉另一端。

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 30600611)及第三军医大学青年科研基金资助项目(XG200540)。 △ 通讯作者。

将 0.1%胰蛋白酶注入脐静脉腔至充盈,37℃消化 10min。收集消化液至塑料离心管中,同时加小牛血清终止胰酶作用,1 000r/min 离心 10min;弃上清液,加入含 20%胎牛血清,30mg/L ECGF 的 PRMI1640 培养基,制备细胞悬液,调整细胞密度为 $2\sim 3\times 10^5$ PmL,滴入培养瓶,置于 37℃ 5%CO₂培养箱中进行细胞培养;24h 后观察细胞贴壁及生长情况并更换培养液。以后每 2d 换液 1 次,每日倒置显微镜下观察细胞生长情况。

1.5 免疫荧光法检测Ⅷ因子相关抗原 HUVEC 接种于预先置于细胞培养板内的盖玻片上至细胞长成单层,弃培养液,0.1 PBS 冲洗 3 次,加入 95%甲醇固定 30min,PBS 冲洗,间接免疫荧光染色,设阴性及空白对照。荧光显微镜下观察。

1.6 肿瘤来源血管内皮细胞的诱导生成 将人肺腺癌 A549 细胞用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 液培养至 70%汇合时,换成无血清的 RPMI1640 液再培养 48h。收集培养上清液,经 0.22μm 滤膜过滤后,于-80℃保存备用。取第 3 代 HUVEC,用含体积分数 50% A549 细胞培养上清液的 HESFM 培养,汇合至 80%时收集细胞,即为 Td-EC。

1.7 肿瘤内皮标志(TEM)的 RT-PCR 检测 收集 1×10^6 个 Td-EC,以正常 HUVEC 为对照组,按 Takara catrimox 214TM RNA isolation kit 说明书提取总 RNA。根据 TEM1 及 TEM8 的 cDNA 设计引物,并由上海博亚生物技术有限公司合成。扩增 TEM1 基因的上游引物为 5'-TCG AGT GTT ATT GTA GCG AGG GAC ATG-3',下游引物为 5'-AGG TGG GCT CCG GGT AGG GTA T-3',扩增片段为 287bp。扩增 TEM8 基因的上游引物为 5'-CGG ATT GCG GAC AGTAAG G-3',下游引物为 5'-GCC AGA ACC ACC AGA GGA G-3',扩增片段为 462bp。按 TakaraBcaBESTTM RNA PCR Kit 试剂盒说明书进行扩增。RT-PCR 产物以 10g/L 琼脂糖凝胶电泳后,用凝胶电泳成像系统摄像。

1.8 内皮细胞迁徙试验(transwell) 将小室放入 24 孔培养板中,在上室加入 300μL 预温的无血清培养基,室温下静置 15~30min,使基质胶再水化。再吸去剩余培养液,分别将 HUVEC、Td-EC 两组内皮细胞种在上室内,制备无血清细胞悬液($2\sim 3\times 10^5$ PmL),24 孔板下室加入 500μL 含 20%FBS 的无血清培养基,放入小室,取细胞悬液 200μL 加入 Transwell 小室,注意防止下层培养液和小室间产生气泡,常规培养 12~24h,取出小室,用棉签擦去基质胶和上室一侧的细胞,用手术刀将膜切下,用 90%酒精常温固定 30min,0.1%结晶紫常温染色 10min,清水漂净,用棉签轻轻擦掉上层未迁移细胞,取 3~5 个视野计数细胞个数。

1.9 细胞周期的测定及电镜下内皮细胞的观察

1.9.1 将 HUVEC、Td-EC 两组内皮细胞分别按每孔 4×10^4 个细胞,每组 6 孔接种到 24 孔板内。培养 3d 后,以 0.25%胰酶消化,收集细胞,800 rpm 离心 5 min,0.01 mol/L PBS 漂洗,吹打成单细胞悬液,70%冷乙醇 4℃下固定 24h,RNAase 消化,碘化丙啶标记,在激发光 488nm、检测光 610nm 下用流式细胞仪检测。

1.9.2 制备细胞悬液 调整细胞浓度 2×10^6 PmL 左右,取 4ml 细胞悬液 1 500r/min 离心 10min,倒出上清液,倒置离心管 5min,加入 2.5%戊二醛 1.5mL,送透射电镜室检测。

2 结 果

2.1 细胞接种 24h 后,普通光镜下可见细胞贴壁 部分细胞分化生长。初长出的细胞为梭形,第 3~5 天,细胞长成片,中

心排列紧密的部分可见呈典型铺路石子状排列的单层细胞,见彩插 III 图 7。

2.2 培养的 HUVEC 经荧光免疫染色后,荧光显微镜下可见胞质内有黄绿色荧光,证实细胞内有内皮细胞特有的人Ⅷ因子相关抗原存在,对照组为阴性反应,见彩插 III 图 8。

2.3 RT-PCR 扩增产物的电泳显示 从 Td-EC 中能扩增出约 290bp 及 460bp 的条带(图 1),说明 HUVEC 经 A549 细胞培养上清液诱导后,具备了肿瘤血管内皮细胞的特性。

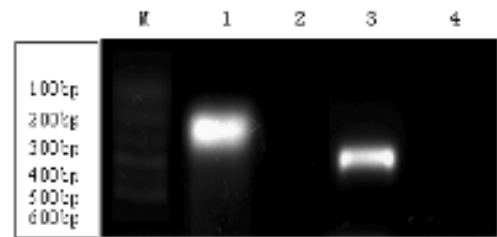
2.4 HUVEC 细胞对照组与 Td-EC 细胞在细胞迁徙能力上差异无统计学意义(P>0.05,见表 1、图 2)。

表 1 对 HUVEC、Td-EC 细胞迁徙能力比较

组别	透过内膜细胞数(个)
HUVEC 组	37.41+3.07
TD-EC 组	38.45+3.57

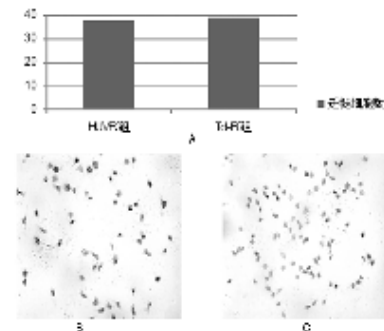
P>0.05。

2.5 透射电镜照片显示 Td-EC 细胞较 HUVEC 细胞器增多,可见细胞内多核仁,见彩插 III 图 9、10。流式检测 HUVEC 细胞 G₀/G₁ 期细胞所占比例为 61.9%,S 期细胞比例为 24.3%,G₂-M 期细胞比例 7.6%;Td-EC 细胞 G₀/G₁ 期细胞所占比例为 22.5%,S 期细胞比例为 53.6%,G₂-M 期细胞比例 14.4%。Td-EC 细胞 S 期、G₂-M 细胞比例明显增多,细胞增殖较 HUVEC 细胞活跃(P<0.01,n=12)。



M:DNA marker,1:TEM1 mRNA 在 Td-EC 中的表达;2:TEM1 mRNA 在 UVEC 中的表达;3:TEM8 mRNA 在 Td-EC 中的表达;4:TEM8 mRNA 在 HUVEC 中的表达。

图 1 TEM1 和 TEM8 mRNA 在 Td-EC 中表达的 RT-PCR 检测



A: HUVEC、Td-EC 细胞迁徙比较, HUVEC 细胞迁徙数 37.41+3.07, Td-EC 细胞迁徙数 38.45+3.57, 两者在细胞迁徙能力上差异无统计学意义(P>0.05);B 为 HUVEC 细胞迁徙图片;C 为 Td-EC 细胞迁徙图片。

图 2 HUVEC、Td-EC 细胞迁徙检测

3 讨 论

HUVEC 的贴壁生长受诸多因素的影响。首先是脐带离体时间。脐带离体后,随着时间的延长,脐静脉内皮细胞某些物

质的含量会发生变化。作者在实际操作中发现离体脐带放置过久易出现水肿增粗,影响内皮细胞的活性和体外培养,脐带取出后,应尽量在 8h 以内使用,且越早越好。其次,酶消化法是常用的细胞培养方法,酶主要有胰蛋白酶和胶原酶 2 种,胶原酶价格相对较贵,而胰蛋白酶价廉易得,并可以降低非内皮细胞的贴壁能力。严格掌握酶的作用浓度、时间和温度,是获得有活性的脐静脉内皮细胞的重要前提条件。浓度过高、消化时间过长,会加重细胞损伤。本实验采用 0.1% 胰蛋白酶在 37℃ 下作用 10min,较其他方法可以获得大量有活性的内皮细胞,为诱导生成 Td-EC 提供了大量的细胞来源。

肿瘤的发生与多种癌基因、抑癌基因的作用密切相关,干扰其中一、二个环节难以获得确切效果。已有充分的证据表明,肿瘤血管内皮细胞具有特有的免疫原性。例如 VEGF 受体、整合素 $\alpha\beta_3$ 等在肿瘤血管内皮细胞表达明显增高。Croix 等^[5]发现,有 9 种 TEM 特异表达于肿瘤血管内皮细胞上。另外,与肿瘤细胞相比,肿瘤血管内皮细胞基因相对稳定而不易产生抗原变异,且不同的肿瘤血管内皮细胞具有部分共同抗原。因此,抗肿瘤血管的免疫治疗可能是一种更具有前景的抗肿瘤治疗方法。本研究中,作者采用肿瘤细胞培养上清液刺激 HUVEC 生长的方法来得到肿瘤来源的内皮细胞,并用 RT-PCR 方法证明,肿瘤细胞培养上清液刺激的 HUVEC 可表达 TEM1 和 TEM8,由于 TEM1 和 TEM8 仅在肿瘤血管内皮细胞上特异性表达,说明刺激后生成的内皮细胞具有肿瘤血管内皮细胞的特性。Kumar 等把与肿瘤细胞共培养后的 HUVEC 作为抗原免疫小鼠,经细胞融合获得了抗肿瘤血管内皮细胞的单克隆抗体^[6],也提示肿瘤细胞培养液刺激的内皮细胞具有肿瘤血管内皮细胞的抗原性。

在抗血管形成机制和药物研究领域,HUVEC 和人微血管内皮细胞(HUMEC)被认为是细胞水平分析的标准模型,但这些成熟的人普通内皮细胞并不能完全代替肿瘤内皮细胞。所以,找到合适的实验模型应用于药物研究和前期临床试验,对于抗肿瘤研究的发展至关重要。本研究中,作者采用 A549 细胞培养上清液刺激 HUVEC 生长的方法来得到 Td-EC,在与肿瘤细胞上清混合培养环境中,HUVEC 细胞生长内环境类似在体肿瘤内血管。有研究表明^[6],A549 细胞上清液包含多种生长因子,如 VEGF、bFGF 等,可以导致内皮细胞内 PDGF- β 等表达增加,HUVEC 细胞增殖调控改变,使细胞增生更加活跃。与 A549 细胞上清液共培养 3~5d 后,探测到细胞表达 TEM1 和 TEM8 等 Td-EC 特异性抗原,透射电镜图像表明细胞出现多核、细胞器增多现象,细胞增生活跃,经过研究证实,Td-EC 细胞迁徙能力与 HUVEC 比较差异无统计学意义($P > 0.05$),细胞周期分析 S 期、G₂-M 细胞比例远大于 HUVEC 细

胞($P < 0.01$),说明刺激后生成的内皮细胞具有肿瘤血管内皮细胞的特性。所以,Td-EC 作为研究体外抗血管生成作用机制的研究模型,比 HUVEC 和 HUMEC 细胞更具有代表性;而且这种方法解决了在体肿瘤血管内皮细胞数量少且难于分离的难题,为实现抗肿瘤血管的免疫治疗提供了一种简单易行的方法。本实验得到的 Td-EC 能否完全代替不同肿瘤来源的内皮细胞,尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Jiang CQ, Liu ZS, Qian Q, et al. Relationship of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) gene expression with vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvessel density (MVD) in human colorectal adenoma and adenocarcinoma [J]. *Ai Zheng*, 2003, 22(11): 1170.
- [2] Scappaticci FA. Mechanisms and future directions for angiogenesis based cancer therapies [J]. *J Clin Oncol*, 2002, 20(18): 3906.
- [3] Zhou Y, Bosch ML, Salgaller ML. Current methods for loading dendritic cells with tumor antigen for the induction of antitumor immunity [J]. *J Immunother*, 2002, 25(4): 289.
- [4] Pytowski B, Goldman J, Persaud K, et al. Complete and specific inhibition of adult lymphatic generation by a novel VEGFR3 neutralizing antibody [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2005, 97(1): 2.
- [5] Croix B, Rago C, Velculescu V, et al. Genes expressed in human tumor endothelium [J]. *Science*, 2000, 289(5482): 1197.
- [6] Wang JM, Kumar S, Pye D, et al. A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumors and normal tissues [J]. *Int J Cancer*, 1993, 54(3): 363.
- [7] Stephan S, Datta K, Wang E, et al. Effect of rapamycin alone and in combination with antiangiogenesis therapy in an orthotopic model of human pancreatic cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(20): 6993.
- [8] Mohamed KM, Le A, Duong H, et al. Correlation between VEGF and HIF-1 alpha expression in human oral squamous cell carcinoma [J]. *Exp Mol Pathol*, 2004, 76(2): 143.

(收稿日期: 2009-03-19 修回日期: 2009-06-19)

(上接第 3101 页)

- of gestation [J]. *Reprod Toxicol*, 2002, 16(6): 791.
- [22] Ata B, Seyhan A, Orhaner S, et al. High dose cabergoline in management of ovarian hyperstimulation syndrome [J]. *Fertil Steril*, 2009, 5: 21.
 - [23] Vardhana PA, Julius MA, Pollak SV, et al. A unique hCG-antagonist suppresses ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) in rats [J]. *Endocrinology*, 2009, 150(8): 3807.

- [24] 夏良斌, 胡静, 李爱斌, 等. 腹水超滤治疗仪治疗重度卵巢过度刺激综合征的临床研究 [J]. *现代妇产科进展*, 2006, 15(8): 630.
- [25] Lainas TG, Sfontouris IA, Zorzovilis IZ, et al. Management of severe early ovarian hyperstimulation syndrome by re-initiation of GnRH antagonist [J]. *Reprod Biomed Online*, 2007, 15(4): 408.

(收稿日期: 2009-06-05)