

人血管内皮细胞在白血病小鼠中参与形成微血管的研究

郭海霞, 梁立阳, 吴燕云, 陈 纯

(中山大学附属第二医院儿科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】研究人血管内皮细胞在建立 NOD/SCID 小鼠白血病微血管中的作用。【方法】NOD/SCID 小鼠分 3 组: A 空白对照组, B 注射 EC 组, C 建立白血病模型后注射 EC 组。通过免疫组化对 NOD/SCID 小鼠骨髓的血管生成及全身肿瘤负荷情况进行评价。【结果】C 组骨髓微血管密度明显大于 A、B 组, 白血病新生的微血管分支多紊乱, 管腔较不规则, 血管形态幼稚。【结论】用人血管内皮细胞成功建立 NOD/SCID 小鼠白血病微血管生成模型, 可用于抗白血病血管生成及相关实验的研究。

关键词:血管生成; 人血管内皮细胞; 白血病

中图分类号: R361

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2008)01-0042-04

Study of Human Endothelial Cell on Construction of Microvessel Angiogenesis in Leukemia Mice

GUO Hai-xia, LIANG Li-yang, WU Yan-yun, CHEN Chun

(Department of Pediatrics, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To study the role of human vascular endothelial cell in angiogenesis in NOD/SCID leukemia mice. 【Methods】 NOD/SCID mice were divided into 3 groups: A, blank group; B, EC injection group; C, leukemia model mice with EC injection group. MVD in bone marrow with cnemis slice were calculated after immunohistochemistry dyeing. Leukemia burden was evaluated in leukemia model mice. 【Results】 Bone marrow MVD in group C was significantly higher than that in group B. Microvessels in leukemia mice had disordered branches and irregular cavity. The morphism of vessels was immature. 【Conclusion】 Microvessel angiogenesis model in NOD/SCID leukemia mice has been constructed successfully with human endothelial cell. It can be used in the study of anti-angiogenesis in leukemia and relative researches.

Key words: angiogenesis; human vascular endothelial cell; leukemia

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(1):42-45]

近年来的研究成果证实了多种血液系统肿瘤存在明显的骨髓血管新生现象^[1-4], 血管生成在白血病的发病机制中有重要作用。血管生成(angiogenesis)是指在原有的毛细血管和/或微静脉基础上通过内皮细胞(endothelial cell, EC)的迁移和增殖, 从已存在的血管处以芽生或非芽生(套迭)的形式生成新的、以毛细血管为主的血管系统的过程。血管内皮细胞含有全部的正常染色体且相对稳定, 所以与白血病细胞相比, 不易发生耐

药。EC 在肿瘤血管生成中发挥重要作用, 故抑制 EC 上特异标记如血管内皮细胞生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)表达可望阻断其与白血病细胞分泌的 VEGF 的结合, 从而抑制新生血管形成, 这需在动物实验中验证。在本研究中将探索人血管内皮细胞在建立 NOD/SCID 小鼠白血病微血管中的作用并对 NOD/SCID 小鼠的血管生成及肿瘤负荷情况进行评价。

收稿日期: 2007-03-25

基金项目: 广东科技计划项目(2006B36301003)

作者简介: 郭海霞(1971-), 女, 汉族, 山东东营人, 博士, 主治医师。E-mail: colettejj@hotmail.com; 陈 纯, 通讯作者, 副教授, 硕士生导师, Tel: 020-81332335; E-mail: chenchun2002@hotmail.com

1 材料和方法

1.1 细胞株及细胞培养

人脐静脉内皮细胞细胞株 EA·hy926 由广东省人民医院心血管研究所单志新博士惠赠。培养: 10 g/L 明胶铺培养瓶。用高糖 DMEM, 用时加 1.2 g NaHCO₃, 1 000 mL 去离子水, 100 u/mL 氨卞青霉素, 100 μg/mL 链霉素, bFGF 4 ng/mL, VEGF 10 μg/mL, 4 mmol/L 的 L-谷氨酸盐, 15% FBS, 0.1 mol/L HCl 调 pH 6.8~7.0, 抽滤除菌。传代时用 0.25% 的胰酶消化。

1.2 人血管内皮细胞在建立 NOD/SCID 小鼠白血病微血管中的作用

EC(EA·hy926 细胞)打入小鼠体内后在骨髓血管的分布。NOD/SCID 小鼠, 在无菌层流笼中饲养(SPF 级), 共 15 只, 分为 3 组, 每组 5 只。A 组: 空白对照组, 每只鼠经尾静脉注射 PBS 0.2 mL。B 组: 注射 EC 组, 每只鼠经尾静脉注射 EC 0.5×10^6 /0.2 mL。C 组: 建立白血病模型后注射 EC 组, 注射 EC 前 3 天尾静脉注射 1×10^7 个(0.2 mL)HL60 细胞, 经尾静脉注射 EC(0.5×10^6)/0.2 mL。

记录各组 NOD/SCID 小鼠的体重变化、毛色及精神、食欲。注射后 14 d 处死小鼠, 取胫骨切片免疫组化染色(SP 二步法), 观察 EC 在骨髓血管中分布及骨髓骨髓微血管密度(microvascular density, MVD); 断尾取小鼠外周血涂片瑞氏-姬姆萨染色后镜检。处死小鼠后取双侧股骨、用无菌眼科剪剪去两端大、小转子, 暴露骨髓腔, 用 5 mL 注射器吸取 PBS 反复将骨髓冲洗入 15 mL 离心管, 直至股骨外观呈白色。将骨髓沉渣离心后涂片、瑞氏-姬姆萨染色后镜检。取肝、脾组织, 以 100 mL/L 甲醛固定 48 h 以上, 石蜡切片, HE 染色后镜检。

1.3 胫骨切片免疫组化染色 (SP 二步法), 计算 MVD

标本的处理: 骨髓标本取出后立即放入纯丙酮液中于 -20℃ 冰箱中固定、脱水 2 h 后, 常规制备石蜡包埋切片。检测方法: 采用 CD31 作为骨髓 EC 的标记抗原, 一抗为兔抗人 CD31 抗体, 二抗采用抗兔 IgG-HRP 多聚体, EC 的免疫组织化学染色参照 S-P 超敏试剂盒的说明书进行。常规 DAB 显色、苏木精复染、脱水、透明、封片。骨髓 MVD 计数方法: 参照文献[3]提出的骨髓微血管计数方案对

每张切片进行 MVD 计数。内皮细胞被染成棕黄色, 从形态上可区分同样被染色的巨核细胞。在不知任何病理和诊断情况下, 在低倍镜(40×)下进行逐个视野的检查, 至少选出血管最丰富的 3 个不相连区域(hot spot), 然后在高倍镜下(200×)计数微血管, 共计数 3 次, 取其平均值, 用每高倍视野(HP)血管数来表示 MVD。任何呈棕黄色阳性的内皮细胞或内皮细胞簇且与邻近血管和骨小梁清楚分开者为 1 个能够计数的血管, 不以是否有管腔或管腔中是否有红细胞为判断标准, 骨小梁内或与骨小梁相连的血管被排除在外。取同一组 5 只小鼠骨髓的平均 MVD, 作为该组的平均 MVD。计数由两位病理科医生在多筒显微镜下同时进行。

1.4 统计方法

实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 SPSS11.0 软件包处理, 进行单因素方差分析。

2 结 果

2.1 EC 细胞 EA·hy926 打入小鼠体内后骨髓 MVD 变化

A 组骨髓未见染色(附图 1-A), B 组(附图 1-B)MVD 7.63 ± 5.66 , 明显少于 C 组(附图 1-C, 26.42 ± 5.42 , $P < 0.05$)。推测肿瘤细胞 HL60 对 EC 有骨髓趋化性。C 组骨髓 MVD 所见: 白血病新生的微血管分支多紊乱, 管腔较不规则, 主要表现为狭窄、扩张或扭曲甚至无管腔, 可见许多细小分支, 血管形态幼稚。新生的微血管呈血窦状、条索状, 管壁薄, 细胞间常有裂隙。

2.2 NOD/SCID 小鼠一般情况

C 组小鼠均出现纳差、少动、毛色晦暗、松散等, 各组体重无显著变化。

2.3 NOD/SCID 小鼠外周血细胞、骨髓细胞形态改变

C 组 NOD/SCID 小鼠外周血细胞、骨髓均可见幼稚细胞分布, 胞浆深蓝, 染色质疏松。A、B 组外周血细胞、骨髓未见幼稚细胞。

2.4 病理学检查

C 组肉眼未见瘤块。同正常肝组织相比镜下肿瘤细胞排列成片状或聚集成团, 瘤块间质血窦丰富, 纤维组织较少(图 2A)。脾白髓区细胞被白血病细胞代替(图 2B)。结合外周血、骨髓细胞形态学检查结果, 说明 HL60 模型鼠已建立。

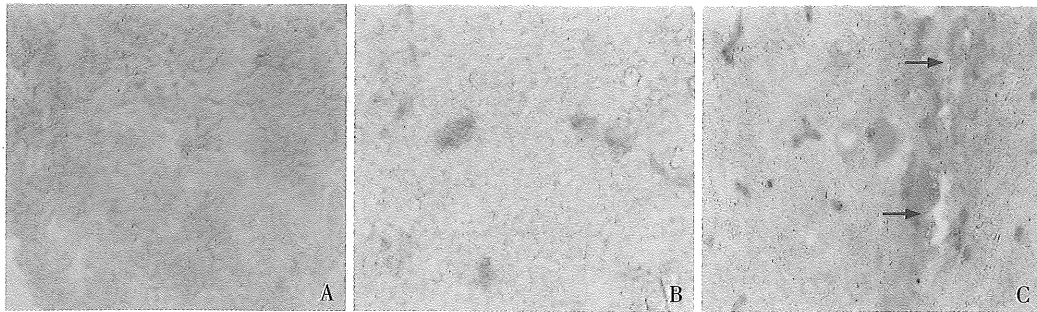


图 1 注射 EC 后 NOD/SCID 小鼠骨髓 MVD 变化

Fig.1 Changes of bone marrow MVD in mice after being injected with EC

A: blank group; B: EC injection group; C: leukemia mouse model with EC injection group. The new microvessels were disordered and the cavity of vessel cavity was irregular (arrow). Immunohistochemical visualization of apoptotic events; $\times 200$

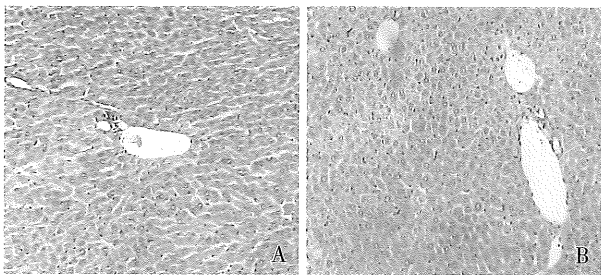


图 2 白血病模型鼠病理切片

Fig.2 Pathology slide of leukemia mouse model

A: liver tissue; B: spleen tissue; HE $\times 100$

3 讨论

当处于正常的生理环境中, 血管生成是一种受到高度调控的现象。血管生成过程是在促进和抑制因子调控下所达到的精巧的平衡。血管生成在实体肿瘤的生长、播散和转移过程中起重要作用^[5,6]。自 1997 年起陆续有研究发现许多血液系统肿瘤均有血管生成的存在^[1-4,7], 并且发现血管生成与儿童白血病的预后有关。传统的化疗和放疗等白血病治疗方法基于直接攻击和消灭白血病细胞本身, 由于白血病细胞基因异质性高、易突变, 往往难以取得满意的疗效; 而破坏少量的血管可使灌流区内的大量肿瘤细胞急剧坏死, 获事半功倍的疗效。大量实验证实, 由白血病细胞分泌的促血管生成因子能够刺激内皮细胞的生长及生存, 而增殖的内皮细胞又通过分泌细胞因子等来促进白血病细胞的增殖^[8-11]。因此随着对白血病血管生成机制的阐明和白血病血管依赖性的认识, 本研究考虑建立动物微血管密度模型以验证一种新的白血病治疗策略, 即白血病血管生成抑制治疗。

肿瘤组织内新生的微血管一般遍布整个肿瘤组织, 但分布上并不均一, 大多数肿瘤新生的微血管主要分布在肿瘤生长活跃的边缘。血管生成最活跃、微血管密度最高的区域叫“血管热点区”(hot spots)。MVD 指切片中血管热点区在一个 200 倍视野下的血管数目。MVD 利用针对 EC 抗原的免疫组化技术对肿瘤微血管进行定量, 可直接量化反映肿瘤的血管生成程度, 它反映了肿瘤微血管形成的强度与肿瘤的侵袭性^[3,12]。有实验证实人 EC 可归巢到白血病模型鼠骨髓血管局部参与血管生成却不增加总血管密度^[13]。本实验中小鼠经静脉注入人 EC, 在 HL60 模型鼠中骨髓 MVD 明显大于非模型鼠, 证明人 EC 可被 HL60 趋化到骨髓, 参与局部肿瘤血管生成, 可能与 HL60 细胞分泌的 VEGF 等因子有关。本实验所见白血病新生的微血管管壁薄; 细胞间常有裂隙, 有时血管外的肿瘤细胞可直接与血管管腔相连, 说明内皮细胞比较幼稚。而正常骨髓组织的微血管管腔大, 分支少见, 形态较成熟。另据报道肿瘤微血管内可出现周细胞的增生, 但常缺乏完整的平滑肌层。这些结构特点可导致其通透性增高, 也是肿瘤发生转移的途径之一。

肿瘤的血管生成机制在一个未血管化的肿瘤和已血管化的肿瘤可能是不同的。目前针对后者的抗血管生成治疗在实验动物都获得很好的效果, 而在临床肿瘤病人疗效甚微。因为动物实验都是应用在未血管化的肿瘤, 而临床应用的是已血管化的肿瘤。因此需探索以人血管内皮细胞在建立 NOD/SCID 小鼠白血病微血管中的作用。已经有研究表明将人源化的 EC 移植到免疫缺陷的鼠可形成人源化的血管样结构, 而将人源化的 EC 和肿

瘤细胞共同移植到免疫缺陷的鼠,可使肿瘤形成人源化的血管并促进肿瘤的生长。这种人源化的肿瘤血管生成模型可能成为评价抗肿瘤血管生成疗效的理想动物模型。本实验首次发现人血管内皮细胞参与小鼠白血病源化微血管生成,将可在此模型上进行抗白血病血管生成及相关实验的研究。

参考文献:

- [1] Padro T, Ruiz S, Beker K, et al. Increased angiogenesis in the bone marrow of patient with acute lymphoid leukemia [J]. *Blood*, 2000, 95(8):2637-2643.
- [2] Perez-Atayde AR, Sallan SE, Tedrow U, et al. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia [J]. *Am J Pathol*, 1997, 150(3):815-821.
- [3] Hussong JW, Rodgers GM, Shami PJ. Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2000, 95(1):309-313.
- [4] Aguayo A, Kantarjian H, Manshouri T, et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes [J]. *Blood*, 2000, 96(6):2240-2245.
- [5] Uhr JW, Scheuermann RH, Street NE, et al. Cancer dormancy: opportunities for new therapeutic approaches [J]. *Nat Med*, 1997, 3(5):505-509.
- [6] Gastl G, Hermann T, Steurer M, et al. Angiogenesis as a target for tumor treatment [J]. *Oncology*, 1997, 54(3):177-184.
- [7] Kini AR, Peterson LA, Tallman MS, et al. Angiogenesis in acute promyelocytic leukemia: induction by vascular endothelial growth factor and inhibition by all-trans retinoic acid [J]. *Blood*, 2001, 97(12):3919-3924.
- [8] Melnyk O, Zimmerman M, Kim KJ, et al. Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody inhibits further growth of established prostate cancer and metastases in a pre-clinical model [J]. *J Urol*, 1999, 161(3):960-963.
- [9] 张育, 顾健, 王敏, 等. 白血病患者血管新生及相关因素研究 [J]. *中华血液学杂志*, 2005, 26(3):175-178.
- [10] McDonnell CO, Hill AD, McNamara DA, et al. Tumor micrometastases; the influence of angiogenesis [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2000, 26(2):105-115.
- [11] Scappatucci FA. Mechanisms and future directions for angiogenesis-based cancer therapies [J]. *J Clin Oncol*, 2002, 20(18):3906-3927.
- [12] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1995, 36(2):169-180.
- [13] Le Ricousse-Roussanne S, Barateau V, Contreres JO, et al. Ex vivo differentiated endothelial and smooth muscle cells from human cord blood progenitors home to the angiogenic tumor vasculature [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 62(1):176-184.
- (编辑 张恩健)
-
- (上接第41页 from page 41)
- 2003, 89(3):585-592.
- [9] Sordella R, Bell DW, Haber DA, et al. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways [J]. *Science*, 2004, 305(5687):1163-1167.
- [10] Erjala K, Sundvall M, Junttila TT, et al. Signaling via ErbB2 and ErbB3 associates with resistance and epidermal growth factor receptor (EGFR) amplification with sensitivity to EGFR inhibitor gefitinib in head and neck squamous cell carcinoma cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(13):4103-4111.
- [11] Chen JS, Pardo FS, Wang-Rodriguez J, et al. EGFR regulates the side population in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Laryngoscope*, 2006, 116(3):401-406.
- [12] Kwak EL, Sordella R, Bell DW, et al. Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(21):7665-7670.
- [13] Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(8):786-792.
- [14] Magne N, Pivot X, Bensadoun RJ, et al. The relationship of epidermal growth factor receptor levels to the prognosis of unresectable pharyngeal cancer patients treated by chemo-radiotherapy [J]. *Eur J Cancer*, 2001, 37(17):2169-2177.
- [15] Zhu BD, Yuan SJ, Zhao QC, et al. Antitumor effect of Gefitinib, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, combined with cytotoxic agent on murine hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(9):1382-1386.
- (编辑 王晓鹰)