

诱导正常血管内皮细胞具备肿瘤血管特性的研究

向邦德¹, 吕明德¹, 黄洁夫¹, 汤庆²

(中山大学附属第一医院 1. 肝胆外科, 2. 超声波科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨用肿瘤细胞培养上清液诱导的人脐静脉血管内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 是否具备肿瘤血管内皮细胞的特性, 旨在寻找一种简便的方法, 解决肿瘤血管内皮细胞不易获得的难题。【方法】HUVEC 用含不同浓度人肝癌细胞株 HepG2 培养上清的条件培养液培养, 3-(4, 5-二甲基噻唑)-5-(3-羧甲酯基)-2-(4-磺苯基)-2 氢-四唑盐法(MTS)检测其增殖率, 免疫细胞化学法结合图像定量分析测量血管内皮细胞生长因子受体 2(VEGFR2)的变化, 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测肿瘤内皮标记物 1 和 8(TEM1、TEM8)的 mRNA 表达。【结果】含体积分数 10%、20%、40% HepG2 培养上清的条件培养液培养, HUVEC 增殖率分别为 71%、89%、109%。HUVEC 用含体积分数 50% HepG2 培养上清液的条件培养液培养后, VEGFR2 平均光密度值明显高于对照组 ($P < 0.05$), 且 TEM1 及 TEM8 呈阳性表达, 而对照组不表达。【结论】HepG2 上清液促进 HUVEC 增殖, 增殖后的 HUVEC 具备肿瘤血管内皮细胞的特性。

关键词:内皮细胞; 血管内皮细胞生长因子受体 2; 肿瘤内皮标记物

中图分类号: R730.59

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)03-0354-04

Study of Inducing Normal Endothelial Cells to Acquire the Characteristics of Tumor-derived Endothelium

XIANG Bang-de¹, LU Ming-de¹, HUANG Jie-fu¹, TANG Qing²

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, 2. Department of Medical Ultrasonics, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate whether human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) can acquire the characteristics of tumor-derived endothelium after cultivation in condition medium contained tumor cell cultured supernatant. The aim of this study was to seek a simple way to obtain tumor-derived endothelial cells. 【Methods】 HUVEC were cultured in condition medium supplemented with cultured supernatant of human hepatocarcinoma cell line HepG2. MTS method was used to measure the proliferation rate of HUVEC. Expression of VEGFR2 was detected by immunocytochemistry and quantified by image analysis. Expression of tumor endothelial marker 1 and 8 (TEM1 and TEM8) mRNA were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). 【Results】 The proliferation rates of HUVEC were 71%, 89%, and 109%, respectively, after cultivation in condition medium supplemented with 10%, 20%, and 40% HepG2 cell cultured supernatant. The average optical density of VEGFR2 in HUVEC cultivation in condition medium supplemented with 50% HepG2 cell cultured supernatant was significantly increased than that in the control groups ($P < 0.05$). Expression of TEM1 and TEM8 mRNA could be positively detected in treated HUVEC, whereas not detected in the control groups. 【Conclusion】 Supernatant from HepG2 culture medium can promote proliferation of HUVEC. After treatment with the condition medium supplemented with HepG2 cell cultured supernatant, HUVEC acquire some characteristics of tumor-derived endothelium.

Key words: endothelial cells; vascular endothelial growth factor receptor-2; tumor endothelial markers

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2005, 26(3):354-357]

收稿日期: 2004-08-25

基金项目: 高等学校博士点科研基金资助项目(20030558065)

作者简介: 向邦德(1972-), 男, 湖南古丈人, 博士生, 主治医师; 吕明德, 教授, 导师, 通讯作者. E-mail: lumd@21cn.com

肿瘤血管是肿瘤形成、生长及转移的基础,以肿瘤血管内皮细胞为靶点的抗肿瘤血管治疗是肿瘤治疗的重要策略之一^[1]。由于实践中从肿瘤组织能够分离得到的血管内皮细胞数量极少,且培养困难,研究工作受到很大限制。本文报告用肿瘤细胞培养上清的方法诱导人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)增殖,检测后者是否具备肿瘤血管内皮细胞的特性,探索一种简便易行的方法,以解决肿瘤血管内皮细胞难于获取的难题。

1 材料与方 法

1.1 材 料

人肝癌细胞株 HepG2 购于中国科学院上海细胞研究所,新生儿脐带由中山大学附属第一医院妇产科提供,兔抗人血管内皮细胞生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)多克隆一抗购于武汉博士德生物工程有限公司, Ultrasensitive™S-P 超敏试剂盒购于福建迈新生物技术开发有限公司,内皮细胞生长支持物 (endothelial cell growth supplement, ECGS), 胶原酶 II 购于美国 Sigma 公司, RPMI 1640 培养液、人内皮细胞无血清培养基 (human endothelial-serum free medium, HESFM) 购于美国 Gibco 公司, RNA 提取试剂盒 Takara catrimox-14™ RNA isolation kit、逆转录聚合酶链反应试剂盒 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)、Takara Bca- BEST™RNA PCR Kit 购于大连宝生物工程有限公司。

1.2 HUVEC 原代培养及鉴定

采用脐带内灌注酶消化分离法。无菌条件下取剖宫产健康新生儿脐带 20~30 cm, 注入 2 g/L 胶原酶 II 消化 15 min, 收集消化液, 250×g 离心 10 min。重悬细胞于含 75 mg/L ECGS、200 mL/L 胎牛血清的 HESFM, 在体积分数 5% CO₂、37 °C 条件下培养。所得细胞用 VIII 因子免疫组化染色鉴定, 取第 3~5 代作为实验材料。

1.3 HepG2 培养上清液的收集

HepG2 用含 100 mL/L 胎牛血清的 RPMI 1640 培养, 当细胞融合达 80% 时更换为无血清的 RPMI 1640 培养液, 48 h 后收集上清液, 0.22 μm 滤膜过滤, -80 °C 保存备用。

1.4 MTS 法检测 HepG2 培养上清液诱导 HUVEC 增殖效应

取对数生长期 HUVEC, 消化后用含 50 mL/L 胎牛血清、38 mg/L ECGS 的 HESFM 调整细胞数密度 5×10⁷/L, 按 100 μL/孔接种于 96 孔培养板。在体积分数 5% CO₂、37 °C 条件下培养 24 h。弃培养基, 分为 4 组, 每组 8 复孔: A 组、B 组、C 组分别加入不同的条件培养液 (含体积分数 10%、20%、40% HepG2 培养上清液的 HESFM); D 组为阴性对照组, 仅加入 HESFM, 并设空白对照组, 总体积 100 μL/孔。培养 48 h 后, 每孔加入 20 μL MTS, 孵育 4 h, 用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长上测定吸光度 (A₄₉₀)。增殖率 % = [(实验组 A 值 - 空白对照组 A 值) - (阴性对照组 A 值 - 空

白对照组 A 值)] / (阴性对照组 A 值 - 空白对照组 A 值)。

1.5 免疫组化法检测 VEGFR2 在 HUVEC 的表达

将无菌处理的盖玻片放于 6 孔板, 取对数生长期的 HUVEC, 消化后用含 50 mL/L 胎牛血清、38 mg/L ECGS 的 HESFM 调整细胞数密度为 5×10⁷/L, 按 3 mL/孔接种于 6 孔板, 37 °C, 体积分数 5% CO₂ 条件下培养 24 h。吸去培养基后分为随机分两组。实验组加入条件培养液 (含体积分数 50% HepG2 培养上清液的 HESFM), 对照组加入 HESFM, 每孔 3 mL, 再培养 48 h。取出盖玻片, 40 g/L 多聚甲醛固定。采用链霉抗生物素过氧化物酶 (SP) 法染色。一抗为兔抗人 VEGFR2 多克隆抗体, 操作按 Ultrasensitive™S-P 试剂盒说明书进行。以磷酸缓冲液代替一抗为阴性对照, DAB 显色。采用德国 KONTRON 公司 IBAS Rel 2.0 图像分析系统进行定量分析, 随机测定 12 个视野平均光密度 [D(λ)] 值。

1.6 RT-PCR 检测 HUVEC 的肿瘤内皮标记物 (tumor endothelial markers, TEM) 表达

HUVEC 用含 50 mL/L 胎牛血清、38 mg/L ECGS 的 HESFM 培养, 待细胞生长至约 60% 融合时换为条件培养液 (含体积分数 50% HepG2 培养上清液的 HESFM), 以仅加入 HESFM 为对照组。48 h 后收集细胞, 按 Takara catrimox-14™ RNA isolation kit 试剂盒说明书提取总 RNA, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 质量。根据 TEM1 及 TEM8 cDNA 自行设计引物并由上海博亚生物技术有限公司合成。TEM1 (上游) 5'-TCGAGTGTTA TTGTAGCGAGGG ACATG-3', (下游) 5'-AGGTGGG CTCGGGTAGGG TAT -3', 扩增片段 287 bp。TEM8: (上游) 5'-CGG ATTGCGGACAGTAAGG-3', (下游) 5'-GCCA GAACC ACCAGAGGAG-3', 扩增片段 462 bp。按 Takara BcaBEST™RNA PCR Kit 试剂盒说明进行扩增, 反转录总反应体系体积 20 μL, 含细胞 RNA 1 μL、随机九引物 1 μL、Bca BEST 聚合酶 22 U, 反转录条件: 65 °C 1 min, 30 °C 5 min, 65 °C 30 min, 98 °C 5 min, 5 °C 5 min。PCR 总反应体系体积 100 μL, 含上下游引物各 1 μL、Bca Optimized Taq 酶 2.5 U。PCR 条件: TEM1, 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 1 min, 40 个循环, 72 °C 5 min 延伸; TEM8, 94 °C 30 s, 48 °C 30 s, 72 °C 1 min, 40 个循环, 72 °C 5 min 延伸。RT-PCR 产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶电泳成像系统摄像, 并送宝生物工程(大连)有限公司测序。

1.7 统计学分析

所有计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS10.0 统计软件分析。HUVEC 增殖效应吸光度 A 值比较采用单因素方差分析, 进一步用 Student-Newman-Keuls 法作两两比较。VEGFR2 平均光密度 D(λ) 值比较用 t 检验。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 HepG2 培养上清液对 HUVEC 增殖的影响

MTS 结果显示: 加入条件培养液的 A、B、C 组 A₄₉₀ 显著高于对照组 D, C 组 A₄₉₀ 显著高于 A 组 (P < 0.05), 表明

HepG2 培养上清液有促进 HUVEC 增殖的作用, 且增殖率随着条件培养液中 HepG2 培养上清液浓度增高而增加(表 1)。

表 1 不同浓度的 HepG2 培养上清液促 HUVEC 增殖效应检测

Table 1 Effects of various concentration of supernatant derived from HepG2 culture medium on the proliferation of HUVEC

Group	<i>n</i>	$A_{490}(\bar{x}\pm s)$	Proliferation rates (%)
A	8	0.34 ± 0.04 ^{1),2)}	71
B	8	0.38 ± 0.04 ¹⁾	89
C	8	0.42 ± 0.05 ¹⁾	109
D	8	0.20 ± 0.06	-

A: $\varphi=10\%$ HepG2; B: $\varphi=20\%$ HepG2; C: $\varphi=40\%$ HepG2; D: negative control. $F=32.29$, $P<0.01$; 1) Compared with control group D, $P<0.05$; 2) Compared with group C, $P<0.05$

2.2 HepG2 培养上清液对 HUVEC 的 VEGFR2 表达的影响

VEGFR2 阳性染色呈棕黄色, 位于细胞浆、细胞膜, 实验组 VEGFR2 染色明显增强(图 1)。平均光密度 $D(\lambda)$ 值: 实验组 0.36 ± 0.02 ; 显著高于对照组 0.30 ± 0.01 ($n=12$, $t=8.50$, $P<0.05$), 表明 HepG2 培养上清液能显著促进 HUVEC 的 VEGFR2 的表达。

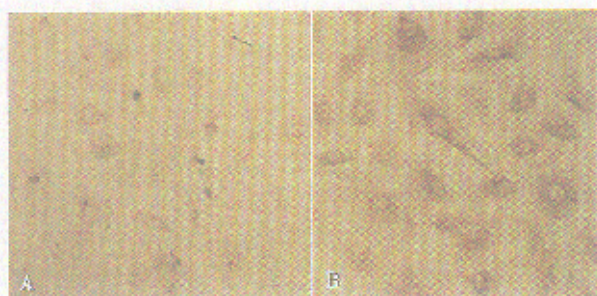


图 1 免疫细胞化学法检测 VEGFR2 在 HUVEC 表达
Fig.1 Expression of VEGFR2 on HUVEC detected by immunocytochemistry staining (SP \times 100)

A: HUVEC not stimulated by supernatant of HepG2; B: HUVEC stimulated by supernatant of HepG2 48 h

2.3 RT-PCR 检测 TEM1 及 TEM8 的表达

RT-PCR 扩增产物电泳显示, 条件培养液培养 48 h 的 HUVEC 分别能扩增出约 290 bp 及 460 bp 的条带, 而单用 HESFM 培养的 HUVEC 未见相应条带(图 2)。PCR 产物 DNA 测序结果与 GenBank 数据库 TEM1 和 TEM8 中相应序列完全相同(基因登录号: TEM1, AF279142; TEM8, AF279145)。

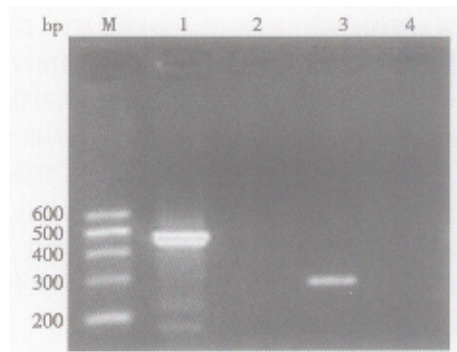


图 2 RT-PCR 法检测 TEM1 和 TEM8 mRNA 在 HUVEC 的表达

Fig.2 Expression of TEM1 and TEM8 mRNA on HUVEC detected by RT-PCR

M: marker; Lane 1: TEM8, HUVEC stimulated by supernatant of HepG2 48 h; Lane 2: TEM8, HUVEC not stimulated by supernatant of HepG2; Lane 3: TEM1, HUVEC stimulated by supernatant of HepG2 48 h; Lane 4: TEM1, HUVEC not stimulated by supernatants of HepG2

3 讨论

肿瘤生长和转移依赖于肿瘤血管的形成, 破坏少量的血管可使灌流区内的大量肿瘤细胞急剧坏死, 获事半功倍之效, 近年来抗肿瘤血管治疗倍受关注^[1]。为进行相关基础研究, 分离培养肿瘤血管内皮细胞是必需的前提条件之一。已有报道采用密度梯度离心、流式细胞技术、免疫磁珠技术等方法^[2-5]进行分离纯化, 但由于肿瘤血管内皮细胞属微血管内皮细胞, 含量极少, 分离过程复杂, 体外培养困难, 且流式抗体或免疫磁珠价格昂贵, 严重限制了研究的开展。本研究采用含人肝癌细胞系 HepG2 培养上清的条件培养液诱导 HUVEC 增殖, 通过检测 VEGFR2 及肿瘤内皮标记, 证明诱导后的 HUVEC 获得了肿瘤血管内皮细胞的特性, 这可能为解决肿瘤血管内皮细胞不易获得的难题提供了一种简便有效的替代方法。

HUVEC 来源于大静脉, 虽具有分化增殖的潜能和新生血管内皮细胞的特性, 但一般认为与肿瘤来源的微血管内皮细胞有明显区别。有学者把与肿瘤细胞共培养后的 HUVEC 作为抗原免疫小鼠, 获得了抗肿瘤血管内皮细胞的单克隆抗体^[6]。亦有人采用肝癌细胞系培养上清液刺激的 HUVEC 作为抗原, 利用杂交瘤技术制备了只与肝癌血管内皮细胞起反应的单克隆抗体^[7]。上述研究提示肿瘤细胞培养液刺激后的 HUVEC 可能在一定程度上具有了肿瘤血管内皮细胞的特性。我们采用含不同浓度 HepG2 培养上清的条件培养液刺激 HUVEC, 检测其增殖效应, 结果显示: 加入上清液后 HUVEC 增殖率明显增高, 且增殖率与上清液的浓度呈正相关, 表明上清液能强烈刺激 HUVEC 的增殖, 这可能与上清液中含有多种肿瘤细胞分泌的促血管

内皮细胞生长的细胞因子有关。

为了探讨增殖后的 HUVEC 是否具有肿瘤血管细胞的特性,本研究进一步检测了 VEGFR2 和 TEM 在刺激后的 HUVEC 的表达程度。VEGFR2 是血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 诱导肿瘤血管形成的最重要受体,在肿瘤血管或伤口新生血管的内皮细胞高表达,而在正常血管内皮细胞不表达或低表达,已被视为肿瘤血管内皮细胞的重要标记^[8,9]。免疫组化法结合图像分析结果表明:正常 HUVEC 虽有 VEGFR2 表达但较弱,加入条件培养液后 VEGFR2 表达明显增强,说明增殖后的 HUVEC 已具备肿瘤血管内皮细胞的特性。

TEM 是最近发现的特异表达于肿瘤血管内皮细胞的标记物,共有 9 种,称为 TEM1-9^[5]。TEM1 表达于肿瘤血管内皮细胞及黄体,而 TEM8 仅表达于肿瘤血管内皮细胞^[5,10,11]。本实验根据 TEM1 及 TEM8 的 cDNA 序列自行设计引物,采用 RT-PCR 方法证明条件培养液刺激后的 HUVEC 在 mRNA 水平表达了 TEM1 及 TEM8,而正常 HUVEC 不表达,这充分证明用 HepG2 上清诱导后的 HUVEC 获得了肿瘤血管内皮细胞特性。但 Opavsky 等^[11,12]报道采用 VEGF、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、碱性纤维母细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, BFGF) 等细胞因子培养 HUVEC,检测 TEM 仍为阴性。我们推测肿瘤血管内皮细胞形成是肿瘤细胞分泌一系列的细胞因子共同作用的结果,单一细胞因子虽然能促进血管内皮细胞增殖,可能尚不足刺激 TEM 的表达,而肿瘤细胞培养上清液含有多种细胞因子,可诱导出 HUVEC 表现肿瘤血管内皮细胞的特性。

参考文献:

- [1] Scappaticci FA. Mechanisms and future directions for angiogenesis-based cancer therapies [J]. *J Clin Oncol*, 2002,20(18):3906-27.
- [2] Wang JH, Wu QD, Bouchier-Hayes D, *et al.* Hypoxia upregulates Bcl-2 expression and suppresses interferon-gamma induced antiangiogenic activity in human tumor derived endothelial cells [J]. *Cancer*, 2002, 94(10): 2745-55.
- [3] Hannum RS, Ojeifo JO, Zwiebel JA, *et al.* Isolation of tumor-derived endothelial cells [J]. *Microvasc Res*, 2001, 61(3): 287-90.
- [4] Bussolati B, Deambrosio I, Russo S, *et al.* Altered angiogenesis and survival in human tumor-derived endothelial cells [J]. *FASEB J*, 2003, 17(9): 1159-61.
- [5] St Croix B, Rago C, Velculescu V, *et al.* Genes expressed in human tumor endothelium [J]. *Science*, 2000, 289(5482):1197-202.
- [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):363-70.
- [7] 夏红天,黄志强,袁玫,等. 抗肝癌血管内皮细胞的单克隆抗体的制备和鉴定 [J]. *中华肝胆外科杂志*, 1999, 5(6): 391-3.
- [8] Brekken RA, Thorpe PE. VEGF-VEGF receptor complexes as markers of tumor vascular endothelium [J]. *J Control Release*, 2001, 74(1-3):173-81.
- [9] 李祥,沈强,匡代军.低强度超声波对辐射后血管内皮细胞影响的体外研究[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2003, 24(4):382-5.
- [10] Nanda A, St Croix B. Tumor endothelial markers: new targets for cancer therapy [J]. *Curr Opin Oncol*, 2004, 16(1):44-9.
- [11] Opavsky R, Haviernik P, Jurkovicova D, *et al.* Molecular characterization of the mouse Tem1/ endosialin gene regulated by cell density *in vitro* and expressed in normal tissues *in vivo* [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(42): 38795-807.
- [12] Rettig WJ, Garin-Chesa P, Healey JH, *et al.* Identification of endosialin, a cell surface glycoprotein of vascular endothelial cells in human cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(22):10832-6.

(编辑 张敏瑞)