文章编号:1000-5404(2005)04-0291-04

论著

人脑恶性胶质瘤微血管内皮细胞的分离培养与体外血管生成特性

蒋雪峰[1],卞修武[1],王清良[1],卢佳友[2],赵 雯[1],史景泉[1] (第三军医大学西南医院:[1]病理科,[2]神经外科,重庆 400038)

提 要:目的 建立人脑恶性胶质瘤微血管内皮细胞(glioma-derived microvascular endothelial cells, GDMEC)体外培养体系并观察其体外毛细血管样结构形成特性。**方法** 采用胰酶、胶原酶联合消化法分离人脑恶性胶质瘤微血管片段,利用结合CD105抗体的MACS MicroBeads免疫磁珠内皮细胞分选系统纯化GDMEC;应用光镜、透射电镜和免疫细胞化学等技术对所获得的GDMEC进行鉴定;采用三维培养模型,观察GDMEC受血管内皮生长因子(VEGF)诱导下的小管样结构(TLS)形成的特性。**结果** 所获GDMEC呈FⅧ-RAg阳性,细胞纯度可达98%;电镜下见Weibel-Palade小体;生长状态良好、可传代培养。这些细胞对VEGF刺激具有良好的反应性,体外易于形成TLS。**结论** 本研究摸索并建立了人脑GDMEC的分离培养方法,所获GDMEC对肿瘤血管生成研究具有重要价值。

关键词: 血管生成;胶质瘤源性微血管内皮细胞(GDMEC);免疫磁珠
中图法分类号: R322.13; R73-351; R730.264 **文献标识码:** A

Isolation, culture, and *in vitro* angiogenic characteristics of microvascular endothelial cells from human malignant glioma

JIANG Xue-feng[1], BIAN Xiu-wu[1], WANG Qing-liang[1], LU Jia-you[2], ZHAO Wen[1], SHI Jing-quan[1] ([1]Institute of Pathology, [2]Department of Neurosurgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish the method for isolating and culturing glioma-derived microvascular endothelial cells (GDMECs) of human brain and to observe their capability to form tubule-like structure (TLS) *in vitro*. **Methods** Trypsin and collagenase were used to isolate microvascular fragments from human malignant glioma tissues and endothelial cells were obtained. The cells were purified using a MACS magnetic cell sorting system with anti-CD105 antibody. GDMECs were identified by immunocytochemistry and electron microscopy. A 3-D model was used for the analysis of TLS formed by GDMECs. **Results** The GDMECs grew well and kept their features through passages. They expressed FⅧ-RAg and the purity was about 98%. Weibel-Palade bodies could be found by electron microscopy. These cells could be stimulated to form TLS by VEGF in a dose-dependent manner. **Conclusion** We have established a practical method for isolating GDMECs, which could be useful for the studies of tumor angiogenesis.

Key words: angiogenesis; glioma-derived microvascular endothelial cell; MACS magnetic cell sorting system

内皮细胞是血管生成的关键细胞,不同组织和器官血管内皮细胞呈现形态和功能的异质性[1]。人们也逐渐认识到,肿瘤组织新生血管内皮细胞与正常组织血管内皮细胞存在差异,但长期以来由于缺乏肿瘤源性微血管内皮细胞分离培养体系和此类细胞系,体外研究肿瘤血管生成时一直都使用源于正常血管内皮细胞甚至内皮细胞样细胞系[2]。因此,分离和培养肿瘤源性微血管内皮细胞在研究肿瘤血管生成机制和抗血管生成药物筛选具有重要意义。脑恶性胶质瘤血管生成极为活跃,是研究肿瘤血管生成的良好材料[3],但目前尚缺乏供胶质瘤血管生成研究的理想体外内皮细胞系及其培养模型。因此,我们采用该肿瘤作为材料来源,摸索和建立人脑胶质瘤源性微血管内皮细胞(glioma-derived microvascular endothelial cell, GDMEC)的分离培养方法。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30270526,30370552)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30270526, 30370552)
作者简介: 蒋雪峰(1973-),男,四川省威远县人,硕士,医师,主要从事胶质瘤病理学和肿瘤血管生成方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68765455
通讯作者: 卞修武,电话:(023)68752247,E-mail:bianxiuwu@263.net
收稿日期: 2004-12-15;**修回日期:** 2005-01-30

1 材料与方法

1.1 标本来源

胶质瘤组织取自我院神经外科手术切除新鲜标本，共16例。无菌取材后迅速将瘤组织放入4 ℃预冷的M199培养液中，低温保存带到细胞培养室。

1.2 主要试剂

M199基础培养液、标准胎牛血清为美国Hyclone公司产品；胶原酶、胰酶为Sigma公司产品；MACS免疫磁珠内皮细胞分选装置及试剂为德国MiltenyiBiotec公司产品；兔抗人FⅧ-RAg多克隆抗体为Zymed公司产品。EnVision™+ 免疫组化试剂盒为Dako公司产品。重组人血管内皮生长因子(rhVEGF165)为美国Cytolab公司产品。

1.3 人脑胶质瘤源性微血管内皮细胞分离、纯化和培养方法

净化工作台上无菌条件下取出瘤组织，放入无菌青霉素小瓶中，以4 ℃预冷的PBS漂洗，用无菌眼科剪将肿瘤组织剪碎至大小约1 mm×1 mm×1 mm，0.25%胰酶消化液，37 ℃振荡水浴30 min。无菌钢网(150目)过滤组织悬液，收集网上沉淀，0.5 mg/ml胶原酶溶液37 ℃消化1～2 h，离心弃上清，PBS洗涤两次。加入M199完全培养液2 ml，轻轻吹散细胞团，移入2%明胶包被的塑料培养瓶中，补加少量培养液，置5% CO_2 孵箱，37 ℃培养。

1.4 内皮细胞纯化

利用MACS免疫磁珠内皮细胞分选系统纯化GDMEC。培养瓶中细胞长至近融合状态时，运用MACS CD105 MicroBeads免疫磁珠分选内皮细胞(图1)。

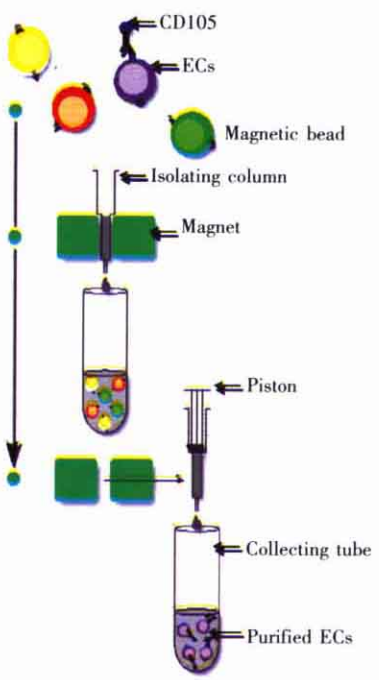


图1 免疫磁珠分选内皮细胞示意图

Fig 1 Immunomagnetic purification of endothelial cells by CD105 MicroBeads

1.5 培养微血管内皮细胞FⅧ-RAg免疫细胞化学染色

用0.125%胰酶+0.02%EDTA液消化GDMEC细胞成单细胞悬液，离心洗涤接种于6孔板中无菌盖玻片上培养48 h。采用EnVision™+ 免疫组化试剂盒，操作步骤按说明书进行。染色前细胞片经0.3% Triton X-100室温处理20 min，PBS代替一抗为阴性对照，以核周胞浆出现明显棕褐色反应判定为阳性结果。

1.6 电镜制样和超微结构观察

取培养瓶中接近长满的GDMEC，用0.125%胰酶+0.02% EDTA液消化离心，4 ℃ PBS漂洗，3%戊二醛4 ℃固定后送电镜室检测。

1.7 GDMEC生长曲线测定

取接近长满的GDMEC消化制成单细胞悬液，调整细胞浓度为2×10^4个/ml，接种至24孔细胞培养板中，每孔1 ml。每3孔为1组，共8组。每隔24 h抽查1组，用血球计数板计数细胞数目，以培养时间为横轴，细胞数对数为纵轴绘制出生长曲线。细胞倍增时间(T_D)按下面公式计算：

$$T_D = t \times \log2/(\log Nt - \log No)$$

其中t代表培养时间，No及Nt分别代表接种时和培养t小时后的细胞数。

1.8 VEGF对GDMEC小管样结构形成的诱导试验

参照我室建立的三维培养模型[4]。取指数生长期GDMEC细胞用0.125%胰酶消化，调整细胞浓度1×10^5个/ml，照上述方法分别接种于96孔细胞培养板中(终浓度分别为0、5、10、15、20 ng/ml VEGF)。M199培养液，每个浓度设4孔。每2天更换培养液液1次。分别于24、48、72、96 h计数TLS形成数目。每孔计数3次，取算术平均数作为各孔的平均管型数。

1.9 统计学分析

TLS数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 10.0统计软件行单因素方差分析。

2 结果

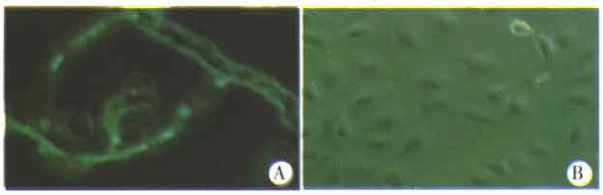
2.1 胶质瘤组织病理学情况

胶质瘤组织均取自我院神经外科手术切除新鲜标本，共16例。成功分离并培养11例，其中传代培养4例，目前最长已传至第5代。本实验选用的GDMEC来源于经常规HE和免疫组织化学染色证实的间变性星形胶质细胞瘤(WHO Ⅲ级)。组织切片见瘤细胞大小不一、弥漫排列；间质血管增生明显，管腔大小不一、管壁厚薄不均。免疫组织化学染色结果：瘤组织GFAP(+)，SYN(-)，VEGF(+)；间质血管内皮细胞CD105(+)，FⅧ-RAg(+)。

2.2 GDMEC形态学观察

相差显微镜下观察，胰酶消化分离所获微血管片段形态各异、长短不等，呈单枝或多枝状，微血管管壁结构较完整(图2A)。经胶原酶再次消化后，微血管管壁变薄、结构不清，但管壁内皮细胞清晰可见；混悬液内还见组织碎片和血细胞。接种于培养瓶24 h见大部分微血管片段均已贴壁；48 h后换液除去组织碎片和血细胞，可见微血管片段边缘长出内皮细胞，

呈多边形或短梭形、核淡、胞膜明显。培养 3～4 d 可见细胞分裂增殖形成的散在细胞克隆；8～10 d 左右细胞生长接近汇合。免疫磁珠分选后的内皮细胞形态以多边形、短梭形为主，最初常形成血管样结构；至亚融合时，呈现出铺路石样形态，至培养第 10 天左右融合成单层片状（图 2B）。细胞紧密排列，互不重叠；核大而圆，境界清楚，可见多个核仁，居于核中央。此外，培养细胞中还见少量体积巨大的细胞，胞浆平展于培养瓶上，部分内皮细胞可见小孔样结构。传代培养平均 7～9 d 1 次。透射电镜观察，见内皮细胞特异性标志物 Weibel-Palade 小体（图 3），呈卵圆形或棒状，其中微管清晰可见。细胞胞浆中内质网、高尔基复合体发达，游离核糖体、线粒体丰富；但吞饮小泡较少。胞浆中还见到较多微管及微丝，尤以胞浆周围部较明显。



A: Microvessel fragments; B: GDMECs grow well

图 2　分离的微血管、生长的内皮细胞形态　（相差显微镜 × 200）

Fig 2　It shows the isolated microvessel fragments and the purified GDMECs in culture　(Phase contrast microscopy × 200)

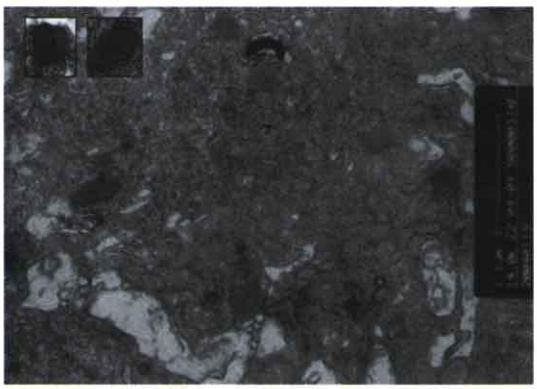


图 3　透射电镜见到内皮细胞中的 W-P 小体　（标尺长度：1.1 μm）

Fig 3　Weibel-Palade bodies observed by transmission electron microscopy　(Bar: 1.1 μm)

2.3　免疫细胞化学染色结果

GDMEC 细胞 FⅧ-RAg 免疫细胞化学检查，98% 的细胞胞浆和核周染成棕褐色，核阴性（按每高倍视野阳性细胞百分比），PBS 空白对照细胞膜、胞浆均未见棕褐色颗粒。

2.4　GDMEC 生长曲线

GDMEC 生长曲线成“S”形，生长过程分 3 个时期，缓慢增殖期、对数生长期、增殖平台期。其特点是缓慢增殖期较长，达 4 d 左右，增殖生长高峰在接种后第 4～7 天。按公式法求得细胞群体倍增时间为 3.5 d。

2.5　VEGF 对 GDMEC 形成 TLS 的作用

在 5、10、15、20 ng/ml 浓度的 VEGF 刺激下，与对照组0 ng/ml 相比，VEGF 在各时相点对小管样结构形成均有促进作用，随浓度升高、时间延长作用越明显（$P < 0.05$，$P < 0.01$）（表 1）。相邻 TLS 可进一步连接成网状。

表 1　不同剂量的 VEGF 刺激组 TLS 形成情况（$n = 4$，$\bar{x} \pm s$）

Tab 1　Effects of VEGF at various concentration on the TLS formation（$n = 4$，$\bar{x} \pm s$）

VEGF(ng/ml)	Culture time			
	24 h	48 h	72 h	96 h
0	0.50 ± 0.58	1.75 ± 0.95	2.00 ± 0.82	3.75 ± 0.96
5	2.75 ± 0.95*	7.75 ± 0.96**	10.5 ± 1.29**	11.5 ± 1.29**
10	5.50 ± 1.29**	11.50 ± 2.08**	14.25 ± 1.25**	15.75 ± 0.95**
15	6.50 ± 1.29**	13.75 ± 1.26**	16.0 ± 0.82**	17.75 ± 1.26**
20	8.00 ± 2.16**	18.25 ± 2.50**	22.75 ± 1.26**	26.00 ± 1.63**

*：$P < 0.05$，**：$P < 0.01$，*vs* 0 ng/ml

3　讨论

3.1　分离和培养肿瘤微血管内皮细胞在血管生成研究中的意义

血管内皮细胞不仅是构成血管组织间屏障的重要成分，而且在调节机体内环境的稳定、维持正常的生理活动以及介导疾病的发生、发展和转归等方面都发挥着重要的作用。微血管内皮也是一种异质性组织，不同组织或血管床微血管内皮常常呈现差异性[5,6]。因此分离、培养不同组织来源的微血管内皮细胞越来越受到人们的重视。

肿瘤血管生成的研究已成为当前肿瘤研究热点，而通过抑制血管生成进行抗肿瘤治疗，被认为是非细胞毒性肿瘤治疗中最有前途的方法之一。内皮细胞是肿瘤血管生成的关键细胞，了解血管内皮细胞活性转变机制及其调节因子，阻断其活性转化途径，从而抑制肿瘤发展和转移已成为抗血管生成治疗肿瘤的重要研究课题。随着蛋白质组学的深入，发现并确定不同肿瘤在不同发展阶段血管生成活性转化中的关键性、特异性蛋白，以此为靶点进行针对性治疗已成为可能。恶性胶质瘤是最常见的脑肿瘤之一，其血管生成极为活跃，且血管构筑和内皮细胞与正常组织均有差异，是研究肿瘤血管生成的良好材料。恶性胶质瘤新生血管高表达 CD105，但迄今为止，国内外尚少见利用标记 CD105 抗体的磁珠纯化 GDMEC 及体外传代培养的报道。本实验分离、纯化获得高纯度 GDMEC（FⅧ-RAg 阳性表达 98%），并在体外成功传代培养。更为重要的是，这些细胞对于在肿瘤血管生成中起作用的关键 VEGF 有良好的反应性，为进一步研究肿瘤血管生成共性和胶质瘤血管生成特性，以及内皮细胞在肿瘤血

管生成中的作用和地位，积极探索更有效的抗肿瘤血管生成治疗方法和途径，提供了良好的实验材料。

3.2 关于GDMEC分离和培养方法及其体会

目前已有正常人体微血管内皮细胞的体外培养取得成功，但培养肿瘤微血管内皮细胞与正常人体微血管内皮细胞相比，难度更大。突出表现在：①肿瘤微血管散布于复杂的肿瘤组织中，分离内皮细胞时易被瘤细胞污染。②分离获得的肿瘤微血管内皮细胞数量受到所取肿瘤组织大小、血管新生化程度及组织活性程度影响很大。③肿瘤微血管内皮细胞的培养条件更为苛刻。一是培养基中要有生长因子的存在，肿瘤微血管内皮细胞生长对生长因子具有依赖性，是促进其增殖所必需；二是培养瓶需包被细胞贴壁因子。④与正常内皮细胞相比，肿瘤微血管内皮细胞增殖较慢、老化更快、传代培养较难[7,8]。其原因可能是一方面肿瘤微血管内皮细胞已在瘤体内经历分裂次数较多；另一方面可能缺乏肿瘤微环境及其所提供的"特异"生长因子，从而加速了体外培养中的老化。所以至今能大量用于体外实验研究的肿瘤微血管内皮细胞仍然非常匮乏。胶质瘤手术标本常较小且碎，术中常受到钳夹、电凝等的影响，获得内皮细胞的难度较其他肿瘤更大。

新近发展的免疫磁珠法获得内皮细胞纯度非常高，适合肿瘤组织内皮细胞的分离纯化。免疫磁珠内皮细胞分选技术的原理是利用结合有内皮细胞表面分子标记物抗体的微小磁珠，在磁性条件下将内皮细胞特异分选出来。常用的内皮细胞分选磁珠有Dynal公司的标记UEA 1、CD31、CD34的磁珠[9]和德国Miltenyi Biotec公司的结合CD105的磁珠。CD34适合于从骨髓或循环血液中分离造血干细胞和内皮祖细胞；CD31除内皮细胞外在血小板和一些白细胞也表达，且在消化时也易被破坏，所以并不是理想的肿瘤内皮分子标记物。本实验中我们选用Miltenyi Biotec公司的标记CD105抗体的磁珠。其优点是：①CD105磁珠特异性强。CD105是内皮细胞增殖的相关标记物，在肿瘤组织活性转化的内皮细胞高表达，并且可作为独立的预后指标[10,11]。肿瘤组织中新生内皮和血管是不成熟的和幼稚的，内皮细胞具有特异性高表达CD105的特性，而且可以作为抗肿瘤血管生成的靶标[12,13]；②对细胞的活性和功能几乎没有影响。标记CD105的MiltenyiBiotec磁珠直径只有50 nm，所获细胞可直接用于随后的功能检测和培养。

综上所述，本部分实验采用新鲜胶质瘤组织消化获得肿瘤微血管片段，在细胞初步扩增后再运用抗CD105的免疫磁珠与内皮细胞特异性结合的原理，分离获得了高纯度可传代并保持对VEGF良好反应性的GDMEC，建立起胶质瘤源性微血管内皮细胞体外培养体系，为研究肿瘤抗血管生成提供了良好的实验材料。

参考文献：

[1] Bian X W, Chen J H, Jiang X F, *et al*. Angiogenesis as an immunopharmacologic target in inflammation and cancer[J]. Int Immunopharmacol, 2004, 4(12): 1537 - 1547.

[2] Ha K T, Lee Y C, Kim C H. Overexpression of GD3 synthase induces apoptosis of vascular endothelial ECV304 cells through downregulation of Bcl-2 [J]. FEBS Lett, 2004, 568(1-3): 183 - 187.

[3] Bian X W, Du L L, Shi J Q, *et al*. Correlation of bFGF, FGFR-1 and VEGF expression with vascularity and malignancy of human astrocytomas [J]. Anal Quant Cytol Histol, 2000, 22(3): 267 - 274.

[4] 白家驷，卞修武，史景泉，等. 恶性胶质瘤细胞诱导内皮细胞三维成型的体外实验[J]. 第三军医大学学报，2004，26(22)：2023 - 2025.

[5] Ribatti D, Nico B, Vacca A, *et al*. Endothelial cell heterogeneity and organ specificity[J]. J Hematother Stem Cell Res, 2002, 11(1): 81 - 90.

[6] Aird M D. Endothelial cell heterogeneity[J]. Crit Care Med, 2003, 31(4 Suppl): S221 - 230.

[7] Alessandri G, Chirivi R G, Castellani P, *et al*. Isolation and characterization of human tumor-derived capillary endothelial cells: role of oncofetal fibronectin[J]. Lab Invest, 1998, 78(1): 127 - 128.

[8] Giordano F, Mitola S. Characterization of endothelial cells isolated by human meningiomas[J]. J Neurosurg Sci, 2000, 44(4): 177 - 185.

[9] Hull M A, Hewett P W, Brough J L, *et al*. Isolation and culture of human gastric endothelial cells[J]. Gastroenterology, 1996, 111(5): 1230 - 1240.

[10] Li C, Gardy R, Seon B K, *et al*. Both high intratumoral microvessel density determined using CD105 antibody and elevated plasma levels of CD105 in colorectal cancer patients correlate with poor prognosis[J]. Br J Cancer, 2003, 88(9): 1424 - 1431.

[11] Dales J P, Garcia S, Carpentier S, *et al*. Prediction of metastasis risk (11 year follow-up) using VEGF-R1, VEGF-R2, Tie-2/Tek and CD105 expression in breast cancer (n = 905) [J]. Br J Cancer, 2004, 90(6): 1216 - 1221.

[12] Takahashi N, Haba A, Matsuno F, *et al*. Antiangiogenic therapy of established tumors in human skin/severe combined immunodeficiency mouse chimeras by anti-endoglin (CD105) monoclonal antibodies, and synergy between anti-endoglin antibody and cyclophosphamide[J]. Cancer Res, 2001, 61(21): 7846 - 7854.

[13] She X, Matsuno F, Harada N, *et al*. Synergy between anti-endoglin (cd105) monoclonal antibodies and TGF-β in suppression of growth of human endothelial cells[J]. Int J Cancer, 2004, 108(2): 251 - 257.

（编辑 张大春）