文章编号:1000-5404(2006)07-0707-03

论著

人原发性肝癌血管内皮细胞的分离培养及鉴定

段世刚,陈 平,朱 瑾,张 林,李 颖,丁纪明 (第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所,重庆 400038)

提 要:目的 建立人原发性肝癌血管内皮细胞体外分离培养体系并研究其体外特性。**方法** 利用酶消化法分离出肝癌组织微血管片段,采用植块培养法培养原代内皮细胞,依次以局部消化法和差速黏附法进行纯化;应用光镜、透射电镜和免疫细胞化学等技术对所获得的人原发性肝癌血管内皮细胞进行鉴定。**结果** 所获人肝癌血管内皮细胞呈FⅧ-RAg阳性;CD34, CD105阳性;电镜下可见Weibel-Palade小体;生长状态良好、可传代培养。**结论** 本研究摸索并建立了人肝癌血管内皮细胞的分离培养方法,所获人肝癌血管内皮细胞对肿瘤血管生成及抗肿瘤药物的研究具有重要价值。

关键词: 原发性肝癌血管内皮细胞;分离培养;组织块法
中图法分类号: R322.12; R329-33; R735.7 **文献标识码:** A

Isolation and culture of human primary hepatic cancer-derived vascular endothelial cells

DUAN Shi-gang, CHEN Ping, ZHU Jin, ZHANG Lin, LI Ying, DING Ji-ming (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish the method for isolating and culturing primary hepatic cancer-derived vascular endothelial cells (PHCDVECs) and to observe their characteristic *in vitro*. **Methods** Enzyme method was used to isolate microvascular fragments from human primary hepatic cancer tissue, and tissue nubbles cultivation was used to isolate microvascular endothelial cells, then purified by local digestion and differential conglutination. PHCDECs were identified by immunocytochemistry and electron microscopy. **Results** The PHCDECs expressed FⅧ-Rag, CD34, CD105. Weibel-Palade bodies could be found by electron microscopy. They grew well and could be passaged *in vitro*. **Conclusion** A practical method was established for isolating primary hepatic cancer-derived vascular endothelial cells and is useful in the studies of tumor angiogenesis.

Key words: primary hepatic cancer; vascular endothelial cell; isolating and culturing; tissue nubbles cultivation

大量研究表明,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],肿瘤组织新生血管内皮细胞与正常组织血管内皮细胞也存在差异。但由于长期以来缺乏肿瘤源性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,培养肝癌血管内皮细胞对研究肝癌的发生、浸润、转移和开发新型药物很有必要。但目前尚缺乏供肝癌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,摸索和建立人原发性肝癌源性血管内皮细胞(primary hepatic cancer-derived vascular endothelial cells,PHCDVECs)的分离培养方法。

1 材料与方法

1.1 标本来源

肝癌组织取自我院肝胆外科手术切除新鲜标本。无菌取材后迅速将瘤组织放入4 ℃预冷的DMEM培养液中,低温保存带到细胞培养室。

1.2 主要试剂

DMEM基础培养液、标准胎牛血清为美国Hyclone公司产品;Ⅳ胶原酶、胰蛋白酶,纤连蛋白(fibronectin)为Sigma公司产品;CD34抗体、CD105抗体,兔抗人FⅧ-RAg多克隆抗体为Zymed公司产品;EnVisio免疫组化试剂盒为Dako公司产品;Percoll购自Pharmacia公司;青、链霉素购自上海生工生物工程有限公司。

作者简介:段世刚(1971-),男,重庆市人,硕士研究生,主治医师,主要从事肝胆胰外科疾病方面的研究。E-mail:duanshigang@sina.com
通讯作者:陈 平,电话:(023)65318301-73078
收稿日期:2005-08-25;修回日期:2005-12-21

1.3 人原发性肝癌血管内皮细胞分离、纯化和培养方法

1.3.1 人原发性肝癌血管内皮细胞分离与培养 净化工作台上无菌条件下取出癌组织，用 PBS 液冲洗尽可能将组织内血液冲洗掉，去除中央坏死组织，将剩下肝癌组织块剪成 1 mm × 1 mm × 1.5 mm 大小，玻璃匀浆器研磨后，200 目不锈钢筛网过滤，收集网上沉淀，放入培养瓶中，加入 0.25% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA 消化液 20 ml，37 ℃振荡水浴 60 min。无菌钢网（200 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 90 min，用医用纱布过滤，最大程度保留毛细血管膜层。挑出毛细血管薄膜样组织块，加入准备好的培养瓶内贴壁并加入适量的培养基，置于 37 ℃、5% 二氧化碳孵箱内培养。第 3 天换液，6 d 血管内皮细胞开始爬出。21 d 后弃去组织块后继续培养并用倒置相差显微镜观察从组织块长出的人肝癌血管内皮细胞。

1.3.2 纯化及传代培养 在细胞传代过程中，加入细胞消化液后，显微镜下观察到 2/3 的纤维样细胞变圆，部分脱壁，立即加入 D-Hanks 液数毫升，轻轻转动培养瓶把 EDTA 消化液冲掉，然后加入 3 ml 含有血清培养基中止消化（约 5 min），然后用弯头吸管轻轻吹打纤维样细胞生长的区域（事先在培养瓶上已画出记号），再用少量培养液漂洗 1 遍，加入适量培养液继续培养。传代培养：纯化的细胞融合后，吸出原培养液，加入消化液，加入完全培养基，并用吸管反复吹打细胞层，使其脱壁；得到的细胞悬液接种于新的培养板内，观察到约 3/4 的细胞已贴壁后（约 13 min），稍加振荡，将培养液连同尚未贴壁的细胞一起吸到另外 1 个培养瓶培养。培养过程中，倒置显微镜下用细胞擦刮去已贴壁的可疑杂细胞。上述操作在前 4 代细胞传代时连续进行，以完成对内皮细胞的纯化。

1.3.3 倒置相差显微镜下观察，显微摄像及图像分析 观察并通过显微摄像记录植块贴壁培养 3、6、8 d 后原代细胞及纯化的细胞传代培养的生长情况及形态变化。

1.3.4 电镜超微结构观察 取培养瓶中接近长满的 PHCDVECs，按要求处理后送电镜室检测。

1.3.5 内皮细胞的鉴定 1～3 代内皮细胞参照免疫组化试剂盒说明方法，以兔抗人 FⅧ-RAg 多克隆抗体、CD34 抗体、CD105 抗体进行染色鉴定。用 PBS 作空白性对照，其余步骤不变。

1.3.6 PHCDVECs 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 1.5×10^4/ml，接种至 24 孔细胞培养板中，每孔 1.5 ml。每 3 孔为 1 组，共 8 组。每隔 48 h 抽查 1 组，用血球计数板计数细胞数目，计算均值。以培养时间为横轴，细胞数（对数）为纵轴绘制出生长曲线。

2 结果

2.1 PHCDVECs 形态学观察

组织块培养后 7～14 d，部分组织块边缘可见有短梭形的以组织块为中心生长的血管内皮细胞（图 1）。初期细胞大多呈短梭形，胞体大，折光性强，少数为多边形及三角形，其间夹杂着少数胞体极细长的成纤维细胞（图 2）。培养细胞经纯化后，镜下观察以短梭形为主，胞体变短并略变小，传代接种后 5 d，细胞开始融合，12～15 d 形成致密融合的单层。

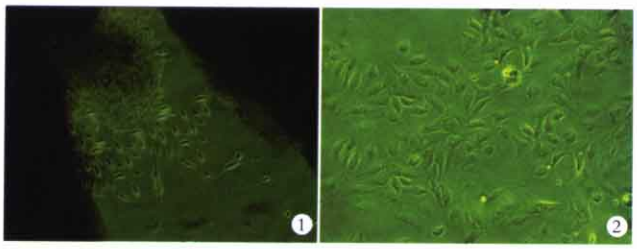


图 1 组织块培养后 7 d 形态学观察 （倒置显微镜 ×100）

图 2 培养初期 PHCDVECs 形态学观察 （倒置显微镜 ×200）

2.2 PHCDMECs 的鉴定

透射电镜显示内皮细胞特异性标志物 Weibel-palade 小体。所分离培养细胞Ⅷ因子相关抗原染色显示细胞质内有棕黄色着色，CD34 阳性，CD105 也呈阳性（图 3－5）。

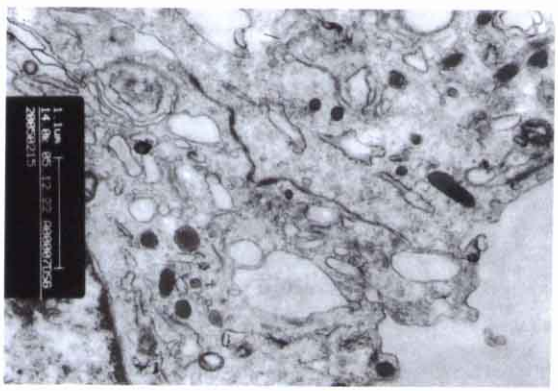


图 3 内皮细胞细胞膜间的紧密连接及特异性标志物 Weibel-palade 小体 （TEM，Bar = 1.1 μm）

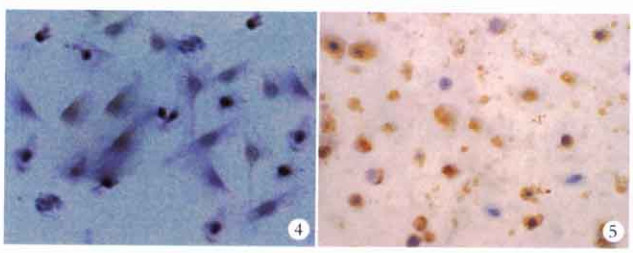


图 4 PHCDVECs FⅧ-RAg 染色细胞质呈棕黄色 （ABC ×200）

图 5 PHCDVECs CD34 染色细胞质呈棕黄色 （ABC ×200）

2.3 PHCDECs 生长曲线测定

原代生长缓慢，3～4 周增生至融合，如果从组织块周边长出细胞少，融合时间会更长。传代细胞增生速度明显加快，第 3～7 天进入对数生长期，7 d 后进入平台期，见图 6。

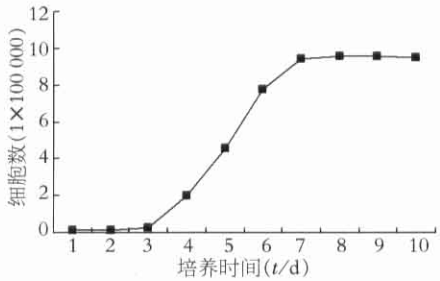


图 6　PHCDVECs 生长曲线

3　讨论

血管内皮细胞在生理及病理的发生发展过程中起作重要作用。目前大量实验研究已证实肿瘤的形成，发展，转移等与血管发生密切相关[3-5]，而内皮细胞的特性及激活与静止是血管生成的关键[6,7]，了解其转变机制及调节因子，阻断其活性转化机制，从而成为抗肿瘤血管形成的重要研究课题。因此，我们采用该肿瘤作为材料来源，摸索和建立人原发性肝癌源性血管内皮细胞的分离培养方法。

查阅文献，未找到分离培养肝癌血管内皮细胞的方法，只能参考其他血管内皮细胞分离富集的方法[8-10]，并多次探索发现：肝癌微血管内皮细胞的分离是成功的关键，刚开始我们采用胰酶及胶原酶消化成单个细胞，然后参照文献[11]进行 Percoll 密度梯度离心，然而发现肝癌组织较硬，分离出血管内皮细胞需较长时间，所得细胞已失去活性。中期我们采用组织块贴壁法，发现游离出血管内皮细胞时间太长，一般超过 12 d，且杂细胞太多，不利于血管内皮细胞的生长及纯化。后期我们采用胰酶及胶原酶消化后再贴壁并用医用纱布过滤，最大程度保留了肝癌毛细血管膜层，这样成功率得到了提高。另外，纯化本实验所需细胞也较为困难，内皮细胞纯化目前有机械刮除法、梯度离心、克隆培养法、FACS 分类法、免疫反应杀伤法、免疫磁珠法等。但是我们发现梯度离心法和克隆培养法并不适合本实验血管内皮细胞的纯化，而后面几种方法比较昂贵不予推荐；我们采用局部消化法和差速粘附法进行纯化，利用内皮细胞较其他细胞脱壁、贴壁更快的特点，进行多次差别传代处理。相对来说较繁杂及增加污染的机会，但只要我们注意无菌操作，且注意动作要稳、准、幅度小，能够达到试验目的，并进行传代培养。

过去认为，培养内皮细胞主要鉴定指标是单层“卵石”样镶嵌排列的形态学特点及人第Ⅷ因子相关抗原的表达。本研究还采用近年国际上广泛采用 CD105 和 CD34 鉴定血管内皮细胞来鉴定。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[12,13]。本实验也出现内皮细胞 CD105 高表达。

综上所述，本部分实验采用新鲜人原发性肝癌组织消化获得肿瘤微血管片段，采用植块培养法培养原代内皮细胞，依次以局部消化法和差速黏附法进行纯化；应用光镜、透射电镜和免疫细胞化学等技术对所获得的人原发性肝癌血管内皮细胞进行鉴定，分离获得了高纯度可传代并生长良好的 PHCDMECs，为研究肿瘤抗血管生成提供了良好的试验材料。

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] FOLKMAN J, SHING Y. Angiogenesis[J]. J Biol Chem, 1992, 267(16): 10931-10934.

[4] FOLKMAN J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? [J]. J Natl Cancer Inst, 1990, 82(1): 4-6.

[5] FIDLER I J. Critical determinants of metastasis[J]. Semin Cancer Biol, 2002, 12(2): 89-96.

[6] HANAHAN D, FOLKMAN J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis[J]. Cell, 1996, 86(3): 353-364.

[7] BOUCK N, STELLMACH V, HSU S C. How tumors become angiogenic[J]. Adv Cancer Res, 1996, 69(2): 135-174.

[8] YAN Q, VERNON R B, HENDRICKSON A E, *et al.* Primary culture and characterization of microvascular endothelial cells from Macaca monkey retina[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996, 37(11): 2185-2194.

[9] MCGINN S, PORONNIK P, GALLERY E D, *et al.* A method for the isolation of glomerular and tubulointerstitial endothelial cells and a comparison of characteristics with the human umbilical vein endothelial cell model[J]. Nephrology (Carlton), 2004, 9(4): 229-237.

[10] GARGETT C E, BUCAK K, ROGERS P A. Isolation, characterization and long-term culture of human myometrial microvascular endothelial cells[J]. Hum Reprod, 2000, 15(2): 293-301.

[11] DENNING-KENDALL P, DONALDSON C, NICOL A, *et al.* Optimal processing of human umbilical cord blood for clinical banking [J]. Exp Hematol, 1996, 24(1): 1394-1401.

[12] 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.

[13] 齐安庆，别　平. 原发性肝细胞肝癌血小板源性生长因子的表达和肿瘤血管形成关系的相关研究[J]. 消化外科，2005，4(2)：119-123.

（编辑　薛国文）