文章编号:1000-5404(2006)10-1077-03

论著

VEGF诱导人脐静脉内皮细胞体外三维成型和对EphrinB2/EphB4表达的影响

党 涛[1],卞修武[1],赵 雯[1],戴 超[2],蒋雪峰[1] (第三军医大学:[1]西南医院病理学研究所,重庆 400038,[2]新桥医院眼科,重庆 400037)

提 要:目的 观察不同浓度血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)对原代培养的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVECs)体外"小管样结构"(tubule-like structures, TLS)形成能力、表达EphrinB及其受体EphB4的影响。**方法** 采用酶消化法分离、纯化人脐静脉内皮细胞并经形态学和免疫细胞化学鉴定。以不同浓度(0.1~50 ng/ml)的VEGF体外处理传代HUVECs,观测时相点设为刺激后24、48、72、96 h;采用Matrigel三维培养系统和免疫细胞化学染色方法分别观测VEGF处理后HUVECs体外血管形成能力以及EphrinB2/EphB4表达的变化,并对后者进行定量分析。**结果** HUVECs有EphB4表达,但未检测到EphrinB2表达;不同浓度的VEGF刺激HUVECs在各观测时间点未见EphB4表达的显著性差异,亦未诱导出EphrinB2表达。VEGF能够诱导HUVECs在Matrigel形成小管样结构,并呈剂量依赖性。**结论** VEGF能以剂量依赖方式诱导HUVECs在Matrigel形成TLS,但不能诱导HUVECs表达EphrinB2或EphB4。

关键词: 人脐静脉内皮细胞;血管内皮生长因子;EphB4;EphrinB2;血管生成
中图法分类号: R34;R394.3 **文献标识码:** A

Inducement of tubule-like structure and EphrinB2/EphB4 expression of human umbilical vein endothelial cells by VEGF

DANG Tao[1], BIAN Xiu-wu[1], ZHAO Wen[1], DAI Chao[2], JIANG Xue-feng[1] ([1]Department of Pathology, Southwest Hospital, [2]Department of Ophthalmology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the in vitro formation of tubule-like structure (TLS) and expression of EphrinB2/EphB4 by human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by vascular endothelial growth factor(VEGF). Methods HUVECs were separated by type Ⅰ collagenase and cultured in a three-dimensional culture system for the TLS formation, exposured to VEGF at concentration from 0.1 ng/ml to 50 ng/ml. Immunocytochemistry was used to examine the effects of VEGF on expression of EphrinB2/EphB4 in HUVECs. Results HUVECs expressed EphB4, but did not express ephrinB2. The expression of EphB4 was not dependent on VEGF concentration. TLS formation was significantly induced by VEGF in a dosage-dependent manner. Conclusion VEGF had the ability to induce HUVECs to form the TLS in three-dimensional culture model and had no stimulation effect on expression of EphrinB2 or EphB4.

Key words: human umbilical vein endothelial cells; vascular endothelial growth factor; EphB4; EphrinB2; angiogenesis

血管生成(angiogenesis)是见于多种病理或生理过程的受多种因素调控的复杂过程,在已知的血管生成因子中,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是能特异性作用于血管内皮的血管生成因子,且作用最强。Ephrin及其受体Eph为新近发现的血管生成调控因子和受体,除具有神经轴突导向、免疫调节、促进胚胎发育的作用外,同样能特异性作用于血管内皮细胞,具有促进细胞增殖、迁移、分化、血管形成、肿瘤发生转移等作用[1,2]。本实验就人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVECs)在VEGF刺激下EphrinB2/EphB4的表达及它们是否和VEGF在体外诱导血管生成之间的相关性进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 HUVECs分离培养

按文献[3],略做改变。主要步骤如下:取足月健康产妇正常分娩脐带(西南医院妇产科,按规定签署知情同意书),剪去术中钳夹部分和有血凝块的部分,用PBS缓冲液冲洗脐静脉至冲洗液清亮,用血管钳钳夹脐带一端,从另一端注入1%的Ⅰ型

作者简介:党 涛(1973-),男,甘肃省武威市人,硕士研究生,主要从事胶质瘤血管生成方面的研究。电话:(023)68765459, E-mail:dangt@sohu.com

收稿日期:2006-04-02;修回日期:2006-05-08

胶原酶(Sigma 公司)溶液 10 ml,置于 37 ℃水浴箱中消化 15 min,用 30 ml 无血清 M199 (Medium 199, Sigma 公司)培养基冲洗消化液,收集冲洗液,1 000 r/min,8 min,小心吸去上清液,沉淀用 M199 完全培养基[M199 含 20% 胎牛血清(fetal bovine serum,FBS,Hyclone 公司),75 μmol/ml 内皮细胞生长添加物(endothelial cell growth supplement, ECGS, Sigma 公司), 2 mmol/L 谷氨酰胺]吹悬后吸入 100 ml 培养瓶,置于 37 ℃ ,5% CO_2饱和培养箱内,24 h 后用无血清 M199 培养基洗去瓶内红细胞和未贴壁的细胞,加 M199 完全培养液,待细胞达到 80% ~ 90% 融合后,加入 1.5 ml 0.125% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化液消化,相差显微镜下见细胞完全消化后,加入新牛血清 1 ml,收集消化液,用 Hanks 液充分漂洗后按 1∶2 传代,经免疫荧光细胞化学法鉴定为内皮细胞后,取 2 - 3 代细胞用于实验。

1.2 HUVECs 的免疫细胞化学鉴定

取 24 孔培养板,每孔内放置 0.8 cm × 0.8 cm 大小的载玻片,其上面滴加含 1×10^4 个细胞/ml 细胞悬液 100 μl,置于 37 ℃培养箱,60 min 后每孔加入 M199 完全培养基 1 ml,继续置于培养箱,24 h 后吸去培养液,用 0.01 mol/L PBS 冲洗 3 次,用 4% 多聚甲醛固定 30 min,用免疫荧光细胞化学法(两步法)染色,一抗为 1∶100 兔抗人Ⅷ因子相关抗原抗体(Sigma 公司),二抗为 1∶25 FITC 标记的羊抗兔 IgG(中山公司分装 Sigma 公司)。荧光显微镜下显色。对照组用 0.01 mol/L PBS 代替一抗。

1.3 体外 TLS 形成实验

用 Matrigel(BD 公司)进行形成 TLS 分析,Matrigel 按说明书使用。原液用无血清 M199 培养基按 1∶3 稀释,96 孔培养板每孔内加入稀释后的 Matrigel 50 μl,震荡使其均匀平铺(以上操作在冰浴上进行),放于 37 ℃培养箱内,30 min 后取出,观察已形成凝胶状,在上面接种 1×10^4 个细胞,加入 VEGF 浓度分别为 0.1、0.5、2.5、5、10、50 ng/ml 的 M199 完全培养基 100 μl,对照组 M199 完全培养基中不含 VEGF。每一浓度种 3 孔,共 21 孔。置于 37 ℃ ,5% CO_2饱和的培养箱内培养,每隔 2 d 换液 1 次。每隔 12 h 倒置显微镜下观察并照相。

1.4 EphrinB2、EphB4 检测和图像分析

取 24 孔培养板,每孔内放置载玻片后接种 2×10^3 个细胞,按 VEGF 浓度 0.1、0.5、2.5、5、10、50 ng/ml 共分 6 组,每组每个浓度 3 孔,留 1 孔作空白对照,分别于接种细胞 24、48、72、96 h 后用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 用 PBS 充分漂洗。用 ABC 法进行 EphrinB2、EphB4 免疫细胞化学检测,一抗为兔抗人 1∶75 EphrinB2 、EphB4 多克隆抗体 (Santa Cruz),其余步骤按 ABC 试剂盒说明进行操作。用 Image Pro Plus(IPP)图形分析软件对阳性细胞进行光密度值分析。

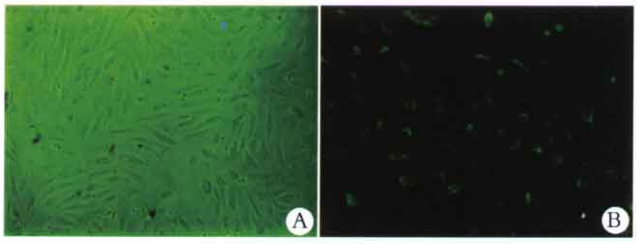
1.5 统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验及单因素方差分析。

2 结果

2.1 HUVECs 形态学观察和鉴定结果

细胞生长状态用倒置显微镜观察,细胞接种后 24 h,大部分细胞团贴壁,36 h 细胞团向外延伸生长,3 d 后,细胞基本伸展,呈单层扁平状生长,长梭形,呈典型的"铺路石"样。Ⅷ因子相关抗原检测在荧光显微镜下见细胞质内绿色荧光(图 1)。



A: 原代培养的 HUVECs 差显微镜下观察呈"铺路石"样排列(相差显微镜 ×100); B: Ⅷ因子相关抗原染色(荧光显微镜 ×100)

图 1 HUVECs 鉴定

2.2 体外 VEGF 对三维 TLS 形成的影响

HUVECs 细胞接种于 Matrigel 胶起始呈圆形或卵圆形,以后随培养时间延长,逐渐贴附于基质胶表面并伸展开,伸出突起,相邻突起相互连接形成小管样结构(图 2)。低浓度的 VEGF(0.1 ~ 0.5 ng/ml)刺激后内皮细胞聚集成团较为明显,形成的小管样结构较少,而 VEGF 浓度在 2.5 ~ 50 ng/ml 时形成小管的数目随 VEGF 剂量增大而增多增多,呈剂量依赖关系,具有显著性差异($P < 0.05$,表 1)。

表 1 不同浓度的 VEGF 刺激组 TLS 形成情况($\bar{x} \pm s$)

VEGF (ng/ml)	培养时间(h)			
	24	48	72	96
0	0.67 ± 0.14	1.67 ± 0.58	5.00 ± 1.00^c	6.67 ± 1.15^c
0.1	1.00 ± 0.00	2.34 ± 0.60	7.38 ± 1.57^c	10.70 ± 100^c
0.5	1.67 ± 0.37	3.34 ± 1.15	10.33 ± 1.37^c	12.30 ± 0.58^c
2.5	4.00 ± 1.00^a	7.24 ± 3.64^a	14.36 ± 0.58^{ac}	18.00 ± 1.14^{ac}
5.0	4.33 ± 0.56^b	11.01 ± 2.00^b	15.32 ± 1.15^{bc}	20.31 ± 1.5b^{bc}
10	4.57 ± 0.53^b	14.05 ± 0.58^{bc}	16.67 ± 1.20^{bc}	22.34 ± 2.08^{bc}
50	6.33 ± 0.48^b	14.67 ± 0.61^{bc}	19.64 ± 1.24^{bc}	23.60 ± 0.51^{bc}

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$,与 0 ng/ml 组比较; c: $P < 0.01$,与 24 h 比较

2.3 VEGF 对 EphrinB2 和 EphB4 表达的影响

显微镜下观察免疫细胞化学检测内皮细胞 EphB4 表达,阳性部位呈棕黄色棵粒状,以核周细胞质较为明显(图 3) ,而 EphrinB2 呈阴性。对 EphB4 阳性部位的平均光密度进行图像分析,用 SPSS 10.0 软件对所测得的光密度值进行统计学处理,无差异($P > 0.05$)。

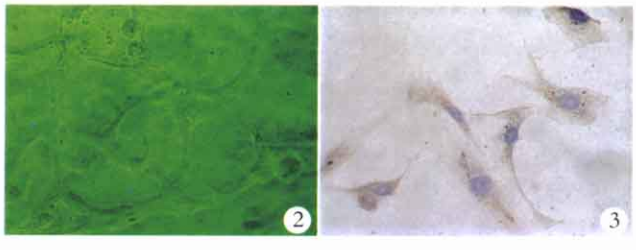


图 2 HUVECs 受 VEGF 诱导形成的 TLS (相差显微镜 ×100)

图 3 HUVECs 表达 EphB4 的细胞免疫化学染色 细胞质内棕黄色部位为阳性 (ABC ×400)

3　讨论

Eph/Ephrin 为近年发现的已知数量最大的受体酪氨酸蛋白激酶家族,由 14 个成员组成,在人体多种组织广泛表达,参与细胞生长、增殖、转化、胚胎发育、血管形成、神经轴突导向、免疫调节、肿瘤形成等生理或病理过程。EphrinB2 及其受体 EphB4 被认为分别是原始动脉和原始静脉相对特异的标记分子[4]。Diehl 等[5]检测到 EphrinB2 在成人皮肤、肌肉和下肢正常的动脉血管内皮细胞中表达,EphB4 存在于动脉和静脉血管。我们在实验中发现培养的原代 HUVECs 不表达 EphrinB2,Foo 等[6]用 Western blot 法也证实 HUVECs 不表达 EphrinB2。Le 等[7]发现,切断和结扎动脉,随血流灌注方向改变,已存在的小动脉会转变成为静脉,EphrinB2 表达下降,反之,静脉亦然, 动静脉分化和 EphrinB2 分布的可塑性是受血流灌注控制的,在脐静脉是否有这种现象,还有待进一步研究。Ephrin/Eph 在相互作用过程中,受体 - 配体复合物内吞使黏附复合物被内吞,从而使相互作用的细胞能够分离。含有 EphrinB 配体膜碎片被内吞入表达 Eph 受体的细胞,从细胞膜移去细胞表面跨膜的配体 - 受体复合物后细胞间地相互作用变得不稳[8]。EphB4 在细胞质内表达,有可能跟这种受体 - 配体复合物内吞有关。再者 Ephrin/eph 表达具有时空特异性,且随细胞的种类和微环境不同有所差异。自 Ephrin /Eph 被发现以来,该家族与其他血管生成因子家族特别是 VEGF 家族之间的相互关系一直有争论。宋文先等[9]研究发现,在胃癌组织中,EphrinB/EphB 与 VEGF 蛋白的表达呈一致性,并促进胃癌血管生成和转移。而 Kim 等[10]认为 EphrinB 通过抑制 VFGF 和 Ang-1 诱导的 RAS/ MAPK 信号途径进而抑制 VFGF 和 Ang-1 诱导的细胞增殖和迁移。多数学者推测 EphB4 可以上调 VEGF 的表达和活性[11]。Wang 等[4]认为 EphrinB 配体体外对毛细血管的诱导,与 Angiopoietin-1 (Ang1) 和血管内皮生长因子(VEGF)的功效相似,EphrinB/EphB 复合物是细胞排斥和黏附的关键调节因子,是建立、维护及重塑细胞组织形态基础,通过基因敲除实验表明,EpnrinB2 /Eph4 在血管形成过程中参与早期的重建,功能和 Ang-1 和 Tie-2 类似。实验表明,Ephrin 没有丝裂原活性,但它们能够调节其他生长因子受体对其受体反应能力,Ephrin 的表达可被 TNF_{α}、VEGF 所调控,它们不能促进内皮细胞的增殖,但可通过整合素促进其迁移、黏附和结合到细胞基质,或发挥排斥作用。Fuller 等[1]研究发现 EphrinB2-Fc 能够抑制内皮细胞参与形成血管网样结构和血管的芽生,而 EphB4-Fc 则有相反的作用,能促进细胞黏附。刺激内皮细胞迁移和血管芽生。Kim 等[10]证实 EphrinB2-Fc 抑制 VEGF 转导的 ERK1/2 磷酸化和 Ras 蛋白活化,而 EphrinB2-Fc 能使 EphB2,EphB4 磷酸化,使 p120-RasGAP 结合至 EphB2 和 EphB4。

综上所述,我们认为在 VEGF 与其受体结合而引起的信号转导过程中,EpnrinB2 和 Eph4 作为信号转导上游的调节因子而发挥其促进内皮细胞增殖、迁移和血管生成的作用,其具体调节机制有待于进一步研究阐明。

参考文献:

[1] FULLER T, KORFF T, KILIAN A, *et al*. Forward EphB4 signaling in endothelial cells controls cellular repulsion and segregation from ephrinB2 positive cells[J]. J Cell Sci, 2003, 116(Pt 12): 2461 - 2470.

[2] 肖华亮, 卞修武, 李增鹏, 等. 用激光共聚焦显微术检测脑星形细胞瘤中 EphrinB2 及 EphB4 蛋白的表达[J]. 癌症, 2004, 23(10): 1161 - 1165.

[3] JAFFE E A, NACHMAN R L, BECKER C G, *et al*. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria[J]. J Clin Invest, 1973, 52(11): 2745 - 2756.

[4] WANG H U, CHEN Z F, ANDERSON D J. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin - B2 and its receptor Eph-B4[J]. Cell, 1998, 93(5): 741 - 753.

[5] DIEHL S, BRUNO R, WILKINSON G A, *et al*. Altered expression patterns of EphrinB2 and EphB2 in human umbilical vessels and congenital venous malformations [J]. Pediatr Res, 2005, 57(4): 537 - 544.

[6] FOO S S, TURNER C J, ADAMS S, *et al*. Ephrin-B2 controls cell motility and adhesion during blood-vessel-wall assembly [J]. Cell, 2006, 124(1): 161 - 173.

[7] LE-NOBLE F, MOYON D, PARDANAUD L, *et al*. Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac [J]. Development, 2004, 131(2): 361 - 375.

[8] NOREN N K, PASQUALE E B. Eph receptor-ephrin bidirectional signals that target Ras and Rho proteins[J]. Cell Signal, 2004, 16(6): 655 - 666.

[9] 宋文先, 卞修武, 杨世昕, 等. 癌组织中 EphB4 受体及其配体 EphrinB2 的表达与血管生成及肿瘤转移的关系[J]. 中华胃肠外科杂志, 2004, 7(6): 492 - 495.

[10] KIM I, RYU Y S, KWAK H J, *et al*. EphB ligand, ephrinB2, suppresses the VEGF- and angiopoietin 1-induced Ras/mitogen-activated protein kinase pathway in venous endothelial cells [J]. FASEBJ, 2002, 16(9): 1126 - 1128.

[11] 朱丛中, 王新允, 郑海燕, 等. EphB4、HIF - 1a 在肺癌组织中的表达及其意义[J]. 中国肺癌杂志, 2005,8(2): 99 - 102.

(编辑　张大春)