文章编号:1000-5404(2006)10-1087-03

论著

人卵巢癌微血管内皮细胞的分离培养与鉴定

阎 萍[1],杨 鹰[1],韩 静[1],黄 健[2] ([1]第三军医大学新桥医院妇产科,重庆 400037;[2]四川省绵阳市人民医院肝胆外科,绵阳 621000)

提 要:目的 建立稳定可靠的卵巢癌微血管内皮细胞分离培养方法。**方法** 取上皮性卵巢癌组织,酶消化,经Percoll分离介质梯度离心得到单个核细胞进行培养,Ⅷ因子相关抗原免疫组化和透射电镜观察鉴定。**结果** 接种后24 h,细胞开始贴壁,呈多边形或短梭形,8~10 d细胞融合成单层片状,呈现出"铺路石样"外观。Ⅷ因子相关抗原免疫组化染色阳性,透射电镜下可见W-P小体。**结论** 本研究方法能够获取体外培养的卵巢癌源性微血管内皮细胞。

关键词:内皮细胞;细胞培养;毛细血管;卵巢癌
中图法分类号:R322.13;R329.24;R737.31 **文献标识码**:A

Isolation, culture and identification of microvascular endothelial cells from human ovarian carcinoma

YAN Ping[1], YANG Ying[1], HAN Jing[1], HUANG Jian[2] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, [2]Department of Hepatobiliary Surgery, The People's Hospital of Mianyang, Mianyang 621000, China)

Abstract: **Objective** To establish a reliable method for isolating and culturing microvascular endothelial cells from human ovarian carcinoma. **Methods** The tissues of human epithelial ovarian carcinoma were finely minced with scissors, then digested. Mononuclear cells were harvested by Percoll gradient centrifugation. The cells were cultured and identified by immunocytochemical staining and transmission electron microscope. **Results** Twenty-four hours after inoculation, the cells began to cohere, presented polygonal or fusiform. Eight or ten days later, cells grew as confluent monolayer like cobblestones. Factor Ⅷ related antigen was expressed and W-P body was shown in the cells by transmission electron microscope. **Conclusion** The microvascular endothelial cells can be obtained *in vitro* from human ovarian carcinoma with our method.

Key words: endothelium cell; cell culture; capillaries; ovarian carcinoma

肿瘤血管新生离不开内皮细胞的激活、增殖及迁移。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[1],但长期以来由于肿瘤源性微血管内皮细胞(tumor-derived microvascular endothelial cells, TdMECs)较难分离培养,体外研究肿瘤血管新生多应用正常组织来源的内皮细胞。因此,分离和培养TdMECs在研究肿瘤血管生成机制及抗血管生成治疗方面具有重要意义。卵巢癌中存在显著的血管生成现象,是研究肿瘤血管生成的良好材料,但目前尚缺乏卵巢癌血管生成研究的理想的体外内皮细胞培养模型。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

DMEM培养粉:Gibco;优等胎牛血清:Hyclone;胰酶、MTT:Amresco;Ⅰ型胶原酶:Roche;dNase Ⅰ:华美生物;bFGF、EGF:达科为公司;青、链霉素:华北制药厂;Percoll:Amersham;Ⅷ因子相关抗原(FⅧ-R Ag)单克隆抗体:福州迈新;S-P试剂盒:北京中山;NICON-TMS倒置显微镜;CO_2孵箱、低温离心机:Heraeus(上海)。

1.2 标本来源

取自第三军医大学新桥医院、西南医院的卵巢癌手术标本,病理诊断符合上皮性卵巢癌。

1.3 实验方法

1.3.1 人卵巢癌微血管内皮细胞的分离、培养 参照Ales-

基金项目:第三军医大学校管青年科研基金资助项目(2002D076)
Supported by the Scientific Research Funds for Young Scholars by Third Military Medical University (2002D076)
作者简介:阎 萍(1976-),女,陕西省西安市人,硕士研究生,医师,主要从事妇科肿瘤方面的研究。电话:(023)65220951
通讯作者:杨 鹰,电话:(023)68774212
收稿日期:2005-11-03;修回日期:2006-02-20

sandri[2]和蒋雪峰等[3]的方法，略作改进。无菌条件下，取卵巢癌组织（不选择坏死、液化及出血的组织），机械法剪碎，0.25%胰酶消化30 min，1 000 r/min离心5 min收集沉淀，PBS洗涤2次，800 r/min离心2 min收集沉淀，用0.5 mg/ml Ⅰ型胶原酶消化10 min后，加入0.02% dNaseⅠ，继续消化1～1.5 h，200目（直径为76 μm）不锈钢筛网过滤，收集滤液，洗涤，重悬。细胞悬液沿管壁缓慢加入装有25%、30%、35%梯度Percoll的离心管中，4 ℃ 2 000 r/min离心20 min，取液面下约2 cm处的云雾状细胞层，DMEM洗涤2次，弃上清，加入DMEM完全培养基（含有15%优等胎牛血清、5 ng/ml bFGF、20 ng/ml EGF、20 U/ml肝素、5 μg/ml氢化考的松、100 U/ml青霉素及100 U/ml链霉素），稀释成4×10^5/ml，接种于100 ml塑料培养瓶中，放入37 ℃，5% CO_2～95%空气饱和湿度培养箱中孵育。差速贴壁1 h以去除成纤维细胞，48 h后换液以除去组织碎片和血细胞，以后每3天换液1次，直至细胞融合。

1.3.2 培养细胞纯化 细胞传代时，在倒置显微镜下刮去已贴壁的可疑杂细胞，加入0.25%胰酶+0.02% EDTA后，显微镜下只要观察到约3/4的细胞回缩近圆形时即终止消化（需1～2 min），加入含血清的培养基终止消化，吸管轻吹瓶底，吸取消化液，1 000 r/min离心5 min收集细胞，PBS洗涤1次。重悬后的细胞按1:（2～3）比例接种培养，方法同前。

1.3.3 卵巢癌微血管内皮细胞的鉴定

1.3.3.1 免疫细胞化学 在24孔板中，每孔内放入1片1 mm×1 mm×0.8 mm的盖玻片，在每片上接种100 μl（2～3）$\times10^5$/ml的2～3代细胞，孵育4 h后加入DMEM完全培养基，换液时间同前。将生长于盖玻片上的细胞用4%多聚甲醛室温固定，PBS洗涤3次后，用FⅧ-R Ag单抗做S-P法染色，DAB显色。细胞质染为棕黄色为阳性。阴性对照用PBS代替Ⅷ-R Ag单抗，其余步骤不变。

1.3.3.2 透射电镜 收集对数生长期的细胞后，电镜固定液固定过夜，送透射电镜检查。

1.3.3.3 细胞生长曲线测定 取第2代近融合的内皮细胞，用0.25%胰酶+0.02% EDTA消化后调节细胞密度为3×10^4个/ml的单细胞悬液，接种于96孔板中，每孔接种180 μl，无细胞培养液做空白对照，每3天换液1次。每日于相同时间点加入MTT溶液（5 mg/ml）20 μl后于37 ℃下培养4 h，然后弃上清液，每孔加入150 μl二甲基亚砜振荡10 min，于酶联免疫仪以490 nm波长测定各孔的吸光度值，连续7 d。以时间为横轴，平均光吸收值为纵轴绘制细胞生长曲线。

2 结果

2.1 人卵巢癌微血管内皮细胞的生长与形态

细胞接种24 h后开始贴壁，接种48 h后换液除去组织碎片和血细胞，细胞开始伸展，呈短梭形或多边形，核淡，培养3～4 d后，细胞数量逐渐增多，8～10 d细胞融合成单层片状，显微镜下形成内皮细胞培养时典型的“铺路石样”外观，见图1。传代细胞初种时为明亮的球形，悬浮于培养液中，6 h后开始贴壁，生长快于原代培养细胞，平均6～7 d传代1次。本实验均采用2代以后的对数生长期细胞。

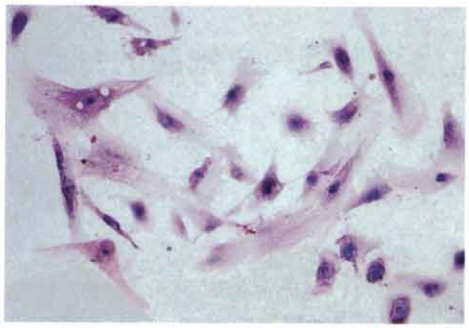


图1 人卵巢癌微血管内皮细胞 （HE×200）

2.2 免疫组化结果

用免疫组化S-P法检测FⅧ-R Ag，85%以上细胞的细胞质中有棕黄色着色，即呈阳性反应，见图2，而阴性对照组无此着色，证实为血管内皮细胞。



图2 纯化后的第3代人微血管内皮细胞，经免疫组化检测Ⅷ因子相关抗原，细胞质呈棕黄色阳性反应 （S-P×400）

2.3 透射电镜结果

透射电镜下可见内皮细胞的特有结构W-P棒状小体，见图3。



图3 人卵巢癌微血管内皮细胞在透射电镜下，可见W-P小体（箭头示） （×28 900）

2.4 生长曲线

传代细胞增殖速度明显加快，第3～5天为对数生长期，第6～7天为平台期，见图4。

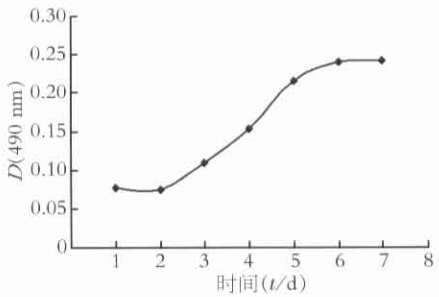


图 4　人卵巢癌微血管内皮细胞生长曲线

3　讨论

微血管一般指微小动脉和微小静脉之间的毛细血管及微血管网,由数个或数十个细胞组成。微血管内皮是一种异质性组织,不同组织、器官甚至同一器官的不同部位微血管内皮都呈现不同的形态及功能特性[4]。肿瘤,特别是实体瘤具有血管生长依赖性的特点,以血管内皮细胞为靶点的抗血管新生治疗由于其高效、非耐药特点已成为肿瘤治疗的研究热点[5]。在以往肿瘤血管新生研究中,大多应用正常组织来源的内皮细胞如人脐静脉内皮细胞(HUVECs),但是 TdMECs 无论从形态上还是从分子表达上都不同于正常内皮细胞(如 HUVECs),不能如实反映肿瘤血管新生的过程及机制,所以,分离和培养 TdMECs 在研究肿瘤血管生成中具有重要意义。卵巢癌中存在显著的血管生成现象,是研究肿瘤血管生成的良好材料。

培养 TdMECs 的难度[3]主要有:①肿瘤微血管散在分布于肿瘤组织中,分离时内皮细胞容易被肿瘤细胞及成纤维细胞污染。②分离获得的微血管内皮细胞数量受到取材的肿瘤组织大小、血管新生程度及组织活性程度影响很大。③TdMECs 的培养条件要求苛刻,包括:血清浓度不低于 15%;培养基中必须有生长因子的存在;细胞贴壁较正常内皮细胞难。④TdMECs 与正常内皮细胞相比,增殖较慢、老化更快、传代培养较难。

本实验选择上皮性卵巢癌组织,在分离培养卵巢癌源性的微血管内皮细胞上进行探索,体会如下:①选择合适的消化方法,适度消化。胰蛋白酶可初步消化卵巢癌组织,去除微血管周围的瘤细胞、血管壁平滑肌细胞及周细胞;胶原酶可进一步消化血管基质和基底膜,以提高获得的微血管内皮细胞数量;dNase I 可消化上述两种消化酶消化过程中细胞释放的 DNA,分散细胞,防止其聚集,使消化液易于过滤,缩短消化时间,减少对细胞的损伤[6]。本实验联合应用3 种消化酶分步消化,降低了实验成本,提高了内皮细胞的接种存活率。②适当的内皮细胞纯化方法。利用不同细胞的比重不同使它们分配到梯度离心液的不同层次中去,经分离后可以得到纯化程度较高的细胞[7];根据卵巢癌来源的微血管内皮细胞形成同一源性的单层内皮细胞这一特点[1],本实验采用 200 目筛网过滤和 Percoll 密度梯度离心,去除初步分离过程中混杂的非内皮细胞,获得高纯度微血管内皮细胞。③特殊的培养基。本实验使用 DMEM,补充加入 15% 优等胎牛血清、5 ng/ml bFGF、20 ng/mlEGF、20 U/ml 肝素、5 μg/ml 氢化考的松,在体外能成功传代培养卵巢癌源性微血管内皮细胞。④其他需注意的事项。本研究中胶原酶用 DMEM 培养基配制,滤网过滤后细胞洗涤的步骤均用 DMEM 培养基代替 PBS,使细胞一直生活在合适的环境中,增高了活细胞的比例。

微血管内皮细胞与大血管内皮细胞的鉴定方法相同:在倒置显微镜下内皮细胞呈现典型的铺路石样,无重叠生成;电镜下可见细胞质中含有特征性的 W-P 小体;FⅧ-R Ag 是内皮细胞特征性标志[8]。本实验选第 3 代细胞进行 FⅧ-R Ag 免疫细胞化学检测,阳性细胞百分率达 85% 以上;透射电镜下可见 W-P 小体。证明本实验采用机械法、酶消化法及密度梯度离心沉降法,分离获得了高纯度可传代的卵巢癌源性微血管内皮细胞,为研究肿瘤血管新生机制及抗血管生成治疗提供了理想的体外实验模型。

参考文献:

[1] ALESSANDRI G, CHIRIVI R G, FIORENTINI S, *et al*. Phenotypic and functional characteristics of tumour-derived microvascular endothelial cells[J]. Clin Exp Metastasis, 1999,17(8): 655 - 662.

[2] 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.

[3] 蒋雪峰, 卞修武, 王清良, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(4): 291 - 294.

[4] AIRD W C. Endothelial cell heterogeneity[J]. Crit Care Med, 2003, 31(4 Suppl): S221 - S230.

[5] AUGUSTE P, LEMIERE S, LARRIEU-LAHARGUE F, *et al*. Molecular mechanisms of tumor vascularization[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2005, 54(1): 53 - 61.

[6] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 386.

[7] 梁光波, 金惠铭. 微血管内皮细胞的分离和培养[J]. 中国微循环, 2002, 6(1): 59 - 61.

[8] 章静波. 组织和细胞培养技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002:72.

(编辑　周　芳)