论著

文章编号:1000-5404(2006)24-2440-04

在人恶性胶质瘤原代培养细胞甲酰化肽受体FPR的表达和功能意义

冯玉慧,卞修武,郭德玉,赵 雯,刘 宏,陈剑鸿 (第三军医大学西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观测甲酰化肽受体(formylpeptide receptor, FPR)在人恶性胶质瘤原代培养瘤细胞的表达和功能活性。**方法** 组织块培养和胰酶消化法分离、培养人恶性胶质瘤细胞并进行鉴定,分别采用间接免疫荧光染色结合激光共聚焦扫描、台盼蓝排染实验结合细胞计数、酶联免疫夹心吸附分析(ELISA)等方法观测培养细胞FPR的表达和定位、FPR配体fMLF活化FPR后细胞增殖以及分泌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的变化。**结果** 部分胶质瘤原代培养细胞可见FPR表达,主要呈线性荧光信号定位于细胞膜;FPR阳性细胞对fMLF的刺激具有反应性,表现为细胞增殖速率加快,VEGF分泌量显著增加。**结论** 部分人恶性胶质瘤细胞存在功能性FPR表达,并可促进瘤细胞增殖和VEGF的产生,在胶质瘤发展及血管生成过程中可能起重要作用。

关键词: 胶质瘤;甲酰化肽受体;血管内皮生长因子;原代培养;血管生成因子

中图法分类号: R392.1;R730.23;R730.264 **文献标识码:** A

Expression of functional formylpeptide receptor FPR by primary human malignant glioma cells

FENG Yu-hui, BIAN Xiu-wu, GUO De-yu, ZHAO Wen, LIU Long, CHEN Jian-hong (Department of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To detect the expression of formylpeptide receptor FPR in primary human glioma cells and its functional activity when stimulated with the ligand fMLF. Methods Human glioma tissues were employed with or without digestion with trypsin for primary culture of glioma cells. By using indirect immunofluorescence and confocal laser scanning microscopy, the expression and localization of FPR in the primary glioma cells were detected. Meanwhile, the cell proliferation *in vitro* and the production of vascular endothelial growth factor (VEGF) by primary cultured cells after FPR activation with its ligand——fMLF, were assessed by trypan blue exclusion assay and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), respectively. Results The primary human malignant glioma cells expressed FPR on the plasma membrane, presenting discontinuous linear fluorescence. After FPR activation by fMLF, the cell proliferation *in vitro* was promoted, and the VEGF level secreted by primary glioma cells was increased significantly. A significantly positive correlation was found between FPR expression and the production of VEGF. Conclusion FPR was selectively expressed by the primary malignant glioma cells, and FPR activation promoted cell proliferation and the production of angiogenic factor VEGF *in vitro*.

Key words: glioma; formylpeptide receptor; vascular endothelial growth factor; primary culture; angiogenesis factor

越来越多的研究表明,趋化因子受体不仅在肿瘤中表达,还对肿瘤的生长、血管生成、转移等具有重要作用。甲酰肽受体(formylpeptide receptor, FPR)属于G蛋白偶联受体超家族,与细菌源性多肽或坏死崩解细胞的线粒体蛋白分解产物N-甲酰化甲硫氨酰-亮氨酰-苯丙氨酰胺(N-formyl-methionyl-leucy-phenylalanine, fMLF)特异结合[1]。FPR最初发现于吞噬细胞表面,对其功能的研究主要在炎症免疫方面。我们最近研究发现,部分恶性胶质瘤细胞系和瘤组织中存在有功能性FPR表达,且与肿瘤级别和微血管密度密切相关[2,3]。我们推测FPR可能对肿瘤具有包括血管生成的重要作用。本研究检测了FPR在原代培养的人恶性胶质瘤细胞中的表达,以及FPR被激活后瘤细胞

作者简介:冯玉慧(1976-),女,黑龙江省哈尔滨市人,硕士研究生,主治医师,主要从事胶质瘤血管生成方面的研究。电话:(023)68765459, E-mail:happyhuier100@sina.com

通讯作者:卞修武,电话:(023)68752247, E-mail:bianxiuwu@263.net

郭德玉,电话:(023)68754432

收稿日期:2006-10-10;修回日期:2006-10-30

体外增殖和血管内皮生长因子（VEGF）分泌水平的变化，以期进一步了解 FPR 在恶性胶质瘤生长及血管生成过程中的调节作用。

1　材料与方法

1.1　标本来源

人脑胶质瘤组织取自本院和新桥医院神经外科手术切除之新鲜标本，共 7 例（胶质母细胞瘤Ⅳ级 2 例；间变型星形细胞瘤Ⅲ级 2 例；星形细胞瘤Ⅱ级 1 例；髓母细胞瘤 2 例）。无菌取材后迅速将瘤组织放入 4 ℃预冷的 DMEM（Hyclone 公司产品）基础培养液中。所有标本均经常规切片、HE 染色和病理诊断证实。

1.2　胶质瘤细胞的分离、纯化及培养

采用胰酶消化法和组织块直接培养法进行分离培养。于层流净化工作台上无菌条件下取出瘤组织，以 4 ℃预冷的无菌 DMEM 基础培养液轻轻漂洗 3 次；用无菌眼科剪将肿瘤组织剪碎至约 2 mm × 2 mm × 1 mm 大小，取出一部分加入 20 倍体积的 0.25% 胰蛋白酶（Sigma 公司产品）消化液，37 ℃水浴消化 20 min。以 80 目孔径无菌不锈钢滤网过滤组织悬液，滤出液移入 10 ml 离心管，800 r/min 离心 5 min 后，以含 25% 胎牛血清（Hyclone 公司产品）的 DMEM 完全培养基轻轻吹散管底有形成分，再移入培养瓶于 37 ℃，5% CO_2 混合气体孵箱中进行培养；将另一部分剪碎的肿瘤组织分散置入培养瓶中进行组织块培养，缓慢将培养瓶翻转，先加入 2 ml DMEM 完全培养基，4 h 后再翻转至正常状态并补加少量培养液继续培养。于倒置显微镜下监测细胞铺展及生长状态，并常规更换培养液直至细胞长出并开始汇合。

培养 8 d，细胞汇合达 70% ~80% 时以 0.25% 胰酶消化细胞并重新贴壁，2 h 后弃去悬浮成分，之后每隔 3 ~4 d 重复上述消化步骤 1 次，直至常规培养。

1.3　培养胶质瘤细胞的鉴定

采用细胞免疫化学 S-P 法，鼠抗人胶质纤维酸性蛋白（glial fibrillary acidic protein，GFAP）抗体和小鼠抗 vimentin 单克隆抗体、即用型 S-P 免疫组化试剂盒及显色剂均为北京中杉生物技术公司产品，按说明书进行操作。以抗体稀释液代替一抗作为阴性对照，阳性对照采用已知 GFAP 阳性的人脑星形胶质细胞，以细胞质内出现明确棕黄色反应判定为阳性结果。

1.4　细胞爬片制备、分组与 fMLF 处理

取培养第 3 ~4 代，进入指数生长期细胞，经 0.25% 胰酶消化后制成单个细胞悬液，用于免疫细胞化学检测的细胞按 5×10^4/ml 密度接种于预先铺置无菌盖玻片的 6 孔培养板内，常规培养 24 h 后以 PBS 缓冲液轻轻漂洗，75% 乙醇室温固定 20 min 后，-20 ℃贮存备用。

将细胞分为空白对照组、10、100、1 000 nmol/L fMLF 处理组，以 5×10^4/ml 密度分别铺种于 6 孔培养板或 50 ml 培养瓶内，每组设 3 个复孔，待细胞贴壁后换以含上述浓度 fMLF 的培养基，对照组为不含 fMLF 之等量无血清培养基，置 37 ℃孵箱中继续培养，并分别于处理后相应时相点收集样本进行各项指标的检测。合成的甲酰化肽 fMLF 购自 Sigma 公司。

1.5　FPR 表达的检测

采用间接免疫荧光染色和共聚焦激光显微术检测。主要步骤为：将制备好的细胞爬片以 0.01 mol/L PBS（pH 7.2）缓冲液漂洗，正常兔血清 37 ℃孵育 30 min 降低非特异性背景染色；加入山羊抗人 FPR（sc-13194）多克隆抗体（美国 Santa Cruz 公司）（1∶80），37 ℃孵育 2 h，4 ℃过夜；滴加异硫氢酸荧光素（FITC）标记的兔抗羊 IgG（美国 Sigma 公司），37 ℃孵育 30 min 后，再加入 5 μg/ml 碘化吡啶（PI）（美国 Sigma 公司）共同孵育 10 min，PBS 充分漂洗，缓冲甘油封片。阴性对照采用抗体稀释液代替一抗进行反应。于激光共聚焦扫描显微镜（LZM 510meta）下观察并摄像，结果输入计算机图像分析系统，转换为灰度模式进行图像分析，以阳性反应细胞总面积和积分光密度表示平均荧光强度。

1.6　VEGF 分泌水平的检测

检测采用双抗夹心酶联免疫吸附（ELISA）分析方法。人血管内皮生长因子（VEGF）ELISA 检测试剂盒为武汉 Boster 公司产品，按说明书进行操作。瘤细胞按 5×10^4/ml 密度铺种于 6 孔板内，分别按上述分组和 fMLF 浓度进行处理，同时另设对照孔（不加 fMLF）和空白孔（无细胞）以消除系统误差，继续培养48 h后收集细胞培养上清，经离心浓缩后检测 VEGF 分泌水平，实验重复进行 2 次。

1.7　细胞增殖的检测

采用台盼蓝排染实验结合细胞计数进行生长曲线评价。瘤细胞以 5×10^4/ml 起始密度接种于 50 cm^2 培养瓶中，细胞贴壁后换以含 100 nmol/L fMLF 的培养基，对照组不含 fMLF；分别于处理后 24、48、72、96 h 经 0.125% 胰酶消化收集细胞，加 0.1%（体积分数）台盼蓝（Sigma）溶液染色后，以血细胞计数板进行活细胞数目测定。各组各时相点分别设 2 瓶细胞，实验重复 2 次取均值，绘制细胞生长曲线。

1.8　统计学分析

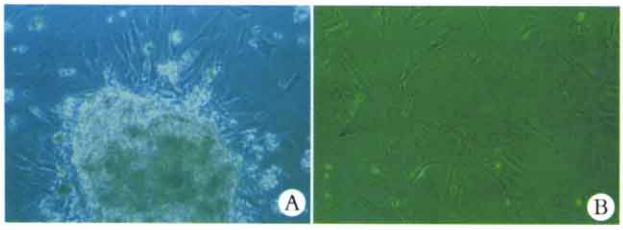
图像分析计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　原代培养细胞的观察及鉴定

本实验中共分离培养人脑胶质瘤组织 7 例，参照 Maxine 等推荐的标准[4]，成功培养 4 例，其余 3 例由于污染原因未培养成功。倒置显微镜下观察，细胞于接种后 24 ~48 h 开始贴壁、伸出突起或自组织块边缘长出，呈圆形、多角形或星形；培养 4 ~5 d 可见细胞分裂增殖形成的散在克隆，8 ~10 d 细胞生长接近汇合。经反复消化贴壁筛选后，细胞形态以星形和短梭形为主（图 1），有的体积较大，突起稍长；细胞质丰富，核大而圆，境界清楚，染色质浅、均匀，可见 1 ~2 个核仁，居于核中央。

免疫细胞化学染色结果显示绝大多数培养细胞呈 vimentin 阳性反应，而仅部分培养细胞可见不同程度的 GFAP 阳性表达，呈浅棕色至深褐色颗粒沉积，定位于瘤细胞的细胞质及突起。

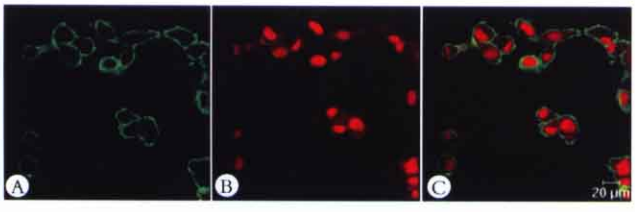


A：接种 72 h；B：纯化后培养第 4 代胶质母细胞瘤细胞

图 1 原代培养的人胶质瘤细胞形态学观察 （倒置显微镜 × 100）

2.2 FPR 的表达与定位

FITC 标记的 FPR 为绿色荧光，PI 标记的细胞核呈红色荧光，4 例成功培养的人脑胶质瘤细胞中仅 2 例可见 FPR 阳性表达，均为胶质母细胞瘤细胞。阳性 FPR 信号呈不连续之线性荧光，定位于瘤细胞膜，而胞质无阳性着色；阴性对照除细胞核红染外，细胞膜、细胞质均无着色（图 2）。



A：FITC 标记；B：PI 标记；C：FITC + PI 标记

图 2 FPR 在原代培养的人胶质母细胞瘤细胞的表达

（免疫荧光 ×200）

2.3 fMLF 刺激对胶质瘤细胞体外增殖的影响

100 nmol/L fMLF 作用后 24 h，瘤细胞生长速度加快，细胞数目增加；48 h 后瘤细胞数量较对照组显著增多，且随 fMLF 作用时间的延长，增加的趋势越明显。统计学分析显示 fMLF 刺激 FPR 活化后 48、72、96 h 的细胞数与对照组相比，差异具有统计学意义（$P<0.01$，$P<0.05$）。

2.4 FPR 激活后胶质瘤细胞 VEGF 分泌水平的变化

以 10、100、1 000 nmol/L 的 fMLF 处理 48 h 活化 FPR 受体，均可增加培养的胶质瘤细胞 VEGF 蛋白的分泌水平，且其分泌量随 fMLF 浓度的增加而逐渐升高。其中 1 000 nmol/L fMLF 刺激后细胞 VEGF 蛋白的分泌量与未刺激对照组相比，差异显著（$P<0.05$）。

3 讨论

越来越多的研究结果表明，趋化因子参与了肿瘤细胞的增殖、侵袭和血管生成过程，在人体多种肿瘤的发生、演进和转移过程中起着重要的作用[5]。甲酰化肽受体 FPR 是一种表达于吞噬性白细胞的 G 蛋白偶联受体，它是中性粒白细胞表面 N-甲酰化肽 fMLF 的高亲和力结合位点。fMLF 是第一个人工合成的外源性 FPR 激动剂，随后从革兰阴性菌培养液的上清中纯化得到天然的 fMLF，当 fMLF 与高亲和力的 FPR 结合后，可通过对百日咳毒素（pertussis toxin，PTX）敏感的 G 蛋白介导的信号途径激活吞噬细胞，进而增强细胞的迁移、吞噬以及炎症介质的释放[6,7]。

趋化因子 FPR 最初发现于吞噬细胞表面，对其功能的研究主要在炎症免疫方面，具有介导趋化反应、细胞脱颗粒和“失敏反应”等生物学功能。后来发现 FPR 广泛存在于不同的细胞、组织和器官，如造血细胞、肝细胞、星形细胞和小胶质细胞以及冠状动脉中膜层、甲状腺、肾上腺、肝脏和神经系统等多种组织也有表达，提示 FPR 不仅参与机体的免疫反应，可能还具有更为广泛的功能[8]。目前有关 FPR 在恶性肿瘤发生发展过程中潜在作用的研究甚少。我们以前的研究结果显示，在 WHO Ⅲ和Ⅳ级的恶性胶质瘤组织有 FPR 表达，推测该受体可能与肿瘤的恶性级别及分化程度有关。本实验从 4 例不同恶性级别的人脑胶质瘤组织中成功分离、培养了胶质瘤细胞，利用免疫荧光染色结合激光共聚焦扫描技术，在恶性程度较高的 2 例人胶质母细胞瘤细胞中检测到 FPR 阳性信号，呈不连续的线性荧光表达于瘤细胞膜，而其他 2 例则未见 FPR 表达。我们还进一步观察到，培养基中加入终浓度为 100 nmol/L fMLF 活化 FPR，在 48 h 后处理组瘤细胞形态改变不明显，但细胞密度增加，细胞生长显著加快，并且，此作用随 fMLF 活化时间的延长而越发明显，这些结果不仅表明 FPR 在人胶质瘤组织及细胞中的表达是呈选择性的，与肿瘤的恶性程度密切相关，也提示表达于恶性胶质母细胞瘤细胞的 FPR 对其配体 fMLF 的刺激具有反应性，活化后的 FPR 可促进瘤细胞的体外增殖，印证了上述推论。

实体肿瘤的生长和转移依赖于新生血管的形成。在众多的血管生成因子中，VEGF 起着关键性的作用。VEGF 是高效的内皮细胞有丝分裂素，直接促进内皮细胞增生，增加内皮细胞的通透性，对肿瘤血管的形成及肿瘤细胞生物学行为均有重要影响[9]。恶性胶质瘤组织以丰富的血管化和坏死病灶为主要特征，而其坏死区肿瘤细胞的培养上清中具有 FPR 激动活性，提示在肿瘤的坏死区和周围受肿瘤压迫的组织中，此受体可以与宿主源性激动剂相互作用。结合移植瘤坏死病灶周围的瘤细胞 FPR 呈强阳性表达，我们分析在肿瘤细胞中的 FPR 可能作为感受器，可以感受肿瘤内部或者周围以旁分泌形式产生的激动剂，进而促进细胞增殖、迁移和 VEGF 基因表达。目前关于 FPR 是否参与血管生成过程的报道极少，有研究显示 FPR 的变异型 FPRL1 与其激动剂 LL37/hCAP-18 结合，在鸡胚绒毛尿囊膜和后肢局部缺血实验中可诱导血管生成。本实验我们检测了 FPR 激活后胶质瘤细胞 VEGF 分泌水平的变化，结果显示：培养基中加入终浓度为 10、

100、1 000 nmol/L 的 fMLF 刺激 FPR 活化后，细胞 VEGF 蛋白的分泌水平均较未刺激组明显增加，且与 fMLF 的浓度呈剂量依赖性。这些结果进一步拓展了我们对 FPR 功能的认识，表明胶质瘤细胞上 FPR 表达和功能活化与其 VEGF 的产生密切相关，并可能在恶性胶质瘤的血管生成过程中具有重要作用。

参考文献：

[1] RABIE M J, HUET E, BOULAY F. Human mitochondria-derived N-formylated peptides are novel agonists equally active on FPR and FPRL1, while Listeria monocytogenes-derived peptides preferentially activate FPR[J]. Eur J Immunol, 2005, 35(8): 2486 - 2495.

[2] SUN R, IRIBARREN P, ZHANG N, *et al*. Identification of neutrophil granule protein cathepsin G as a novel chemotactic agonist for the G protein-coupled formyl peptide receptor[J]. J Immunol, 2004, 173(1): 428 - 436.

[3] LE Y, IRIBARREN P, ZHOU Y, *et al*. Silencing the formylpeptide receptor FPR by short-interfering RNA[J]. Mol Pharmacol, 2004, 66(4): 1022 - 1028.

[4] FARR-JONES M A, PARNEY I F, PETRUK K C. Improved technique for establishing short term human brain tumor cultures[J]. J Neurooncol, 1999, 43(1): 1 - 10.

[5] 陈剑鸿，卞修武，杨世昕，等. 大鼠胶质瘤细胞系 C6 趋化因子受体 CXCR4 和甲酰肽受体 FPR 的表达[J]. 第三军医大学学报，2005, 27(17): 1722 - 1724.

[6] LE Y, SUN R, YING G, *et al*. The role of peptide receptors in microbial infection and inflammation[J]. Curr Med Chem Anti-Infet Agents, 2003, 2(1): 83 - 93.

[7] LE Y, MURPHY P M, WANG J M. Formyl-peptide receptors revisited[J]. Trends Immunol, 2002, 23(11): 541 - 548.

[8] ZHOU Y, BIAN X, LE Y, *et al*. Formylpeptide receptor FPR and the rapid growth of malignant human gliomas[J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97 (11): 823 - 835.

[9] BIAN X W, CHEN J H, JIANG X F, *et al*. angiogenesis as and immunopharmacologic target in inflammation and cancer[J]. Int Immunopharmacol, 2004, 4(12): 1537 - 1547.

（编辑 栾 嘉）

文章编号：1000-5404(2006)24-2443-01

个案与短篇

肾性癫痫致双侧股骨颈骨折 1 例

王 雨，王爱民，杜全印，吴思宇，赵玉峰 （第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军战创中心创伤二科，重庆 400042）

患者，男性，18 岁，因心累、乏力 4 年，加重伴腰痛半年，尿痛 10 d 入我院肾内科，体质一直较差。查体：慢性病容，重度贫血貌，精神萎靡，双肾区叩痛，双下肢无凹陷性水肿。肾功示：尿素 30.5 mmol/L，肌酐 1 021.00 μmol/L。血常规示：RBC 1.86×10^{6}，HGB 57 g/L。生化示：血钙 1.56 mmol/L。B 超示：双肾萎缩。初步诊断：慢性肾功能衰竭（尿毒症期）。入院后给予血透及对症治疗，入院后第 4 天 17:00 突然神志不清，口吐白沫，两眼上翻，全身抽搐，持续约 40 s，给予镇静、吸氧、吸痰后好转。清醒后诉双髋部疼痛，双下肢不能活动。双髋正位片示双侧股骨颈骨折（经颈型）。转入我骨创伤科，术前给予补钙、纠正贫血及血液透析等对症治疗，术中在 C 臂透视下行股骨颈骨折复位，经皮空心加压螺纹钉内固定。术后转回肾内科进行血液透析，并等待肾移植治疗。

讨论

慢性肾功能不全尤其尿毒症期可出现多种并发症，其中钙磷代谢障碍、维生素 D 缺乏及继发性甲状腺功能亢进往往引起肾性骨病，使骨折的潜在危险性大大增加。同时蓄积于血液中的各种中、小分子尿毒素及水、电解质、酸碱平衡紊乱等易引起尿毒症脑病，可表现为肌阵挛和癫痫样发作，抽搐时肌肉强力收缩易导致骨折。癫痫大发作时肌肉抽搐引起的骨折并不少见，但肾性癫痫导致的双侧股骨颈同时骨折国内、外罕见。而尿毒症合并癫痫患者通过充分的透析或肾移植，可以有效的解除其临床症状[1]。

本例患者尿毒症患者手术存在很大风险，围手术期处理不当可引起严重后果。处理的关键是手术前、后应纠正水、电解质和酸碱平衡紊乱，纠正贫血和凝血功能障碍，防止感染等。患者 18 岁，采用经皮空心加压螺钉固定股骨颈骨折，切口小，出血小、不暴露骨折端，不破坏股骨头血运，可提高骨折愈合率，同时也减轻创伤对于肾脏的负担。同时品字型 3 枚空心加压螺纹钉既可以对抗剪力，又可以对抗折弯力，同时还可以加压，对抗骨折端分离，可增加骨折端的稳定性，促使骨折愈合。术后可以早起活动，有效避免因长期卧床而引起的肺炎、褥疮、尿路感染、肌肉萎缩、关节僵直等并发症，可极大的提高患者生命质量，增强生存的信心，对随后的透析和肾移植治疗提供良好的准备。

关键词：癫痫；尿毒症；股骨颈骨折
中图法分类号：R683.420.2 文献标识码：B

参考文献：

[1] 贾俊亚，丁国华，王学玉，等. 慢性神功能衰竭并发肌阵挛临床研究[J]. 临床肾脏病杂志，2004, 4(1): 19 - 20.

（编辑 薛国文）

作者简介：王 雨（1979 - ），男，重庆市人，博士研究生，医师，主要从事人工关节置换、创伤方面的研究。电话：13308912705
通讯作者：王爱民，电话：(023)68757274，E-mail：trauma2@163.com
收稿日期：2006-09-01；修回日期：2006-10-30