文章编号:1000-5404(2009)18-1809-02

短篇论著

血管内皮生长因子在外周血内皮祖细胞体外三维血管新生中的作用

施 森[1],宋 丽[2],何延政[1],刘 勇[1],葛红卫[3],钟 武[1],杨 辉[1],曾 宏[1] (泸州医学院附属医院:[1]血管外科,[2]麻醉科,四川 泸州 646000;[3]江苏省常州市第一人民医院血管外科,江苏 常州 213017)

摘 要:目的 观察血管内皮生长因子(VEGF)在三维血管新生中的作用。**方法** 取大鼠外周血,密度梯度离心法分离出内皮祖细胞,以VEGF为诱导因子,观察VEGF对大鼠外周血内皮祖细胞体外培养和扩增的影响,同时重点建立三维立体模型并分析VEGF在外周血内皮祖细胞体外三维血管新生中的作用。**结果** VEGF实验组细胞在三维基质内向胶原基质内生长,24 h内即可出现向胶原内的出芽及浸润并逐渐形成分支样结构,对照组细胞生长慢、出芽慢,管状结构细小,向胶原内浸润的深度浅,网状结构稀疏、不完整。VEGF实验组与对照组新生血管数目比较差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 鼠尾胶原凝胶可以诱导内皮祖细胞表现出血管新生中的迁移、增殖、发芽等;VEGF能动员和诱导内皮祖细胞促进血管新生。

关键词: 内皮祖细胞;三维血管新生模型;血管内皮细胞生长因子
中图法分类号: R318.11;R322.12;R329.28 **文献标识码:** A

随着血管组织工程技术的不断完善,内皮祖细胞在组织工程中的应用及其促进血管新生的作用机制得到了重视。VEGF是目前相关研究的热点,它在二维平面培养中已证实能促进血管新生[1],但三维培养在生物学及细胞形态上都与二维有很大的区别。因此我们设计本实验来研究可溶性因子VEGF在内皮祖细胞体外三维血管新生中起何作用以及探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂

成年健康雄性Sprague-Dawley大鼠,4月龄,体质量(200±5)g,由泸州医学院实验动物中心提供。M199培养液培养基(Sigma公司),胎牛血清(杭州四季青生物工程公司),Ficoll 1.077A(Pharmacia公司),兔抗鼠Ⅷ因子及CD133抗体、羊抗兔IgG(Sigma公司),VEGF(Prospect公司),Ⅰ型胶原和纤连蛋白(Sigma公司),兔抗鼠ET-4及NOS-3(北京博奥森公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠外周血内皮祖细胞(EPC)的体外分离培养 抽取SD大鼠动脉血10 ml抗凝,加M199等倍稀释并混匀。沿管壁缓慢加入装有Ficoll分离液(1.073 g/ml)的50 ml离心管中。2 000 r/min×30 min密度梯度离心后将中间的白雾层吸出并置入另一离心管中,加入5倍以上体积的M199,以1 300 r/min离心5 min,洗涤细胞2次。末次离心后,弃上清,加入M199重悬细胞。取1滴细胞悬液与1滴2.0 g/L台盼蓝染液混合,滴于血球计数板上,计数4个大方格内细胞的总数。以1×10^6/L的密度接种于加有M199完全培养液的预涂纤连蛋白培养皿中以后期观察,另取一部分悬液接种于放置有多聚赖氨酸处理的玻片的培养皿内,做细胞爬片,用免疫组化染色法鉴定。置37 ℃、50% CO_2饱和湿度培养箱中培养。3 d后换液,将未贴壁细胞弃之。此后每隔3 d更换培养液(完全培养液中含有M199、20%胎牛血清、10 ng VEGF及双抗),细胞长满后用胰酶消化备用。

1.2.2 三维模型的建立 冰上将胶原液4 ml与0.5 ml 10×M199培养液、0.5 ml 1 mol/L NaOH在10 ml试管中混匀,将之加入24孔培养板上,每孔加入0.3 ml。置入37 ℃、50% CO_2饱和湿度培养箱中,待凝固后取出,表面加入上述从外周血中分离的悬液并补足完全培养液,培养于培养箱中,待细胞融合至70%~80%时添加另一层胶原。对照组培养液中不含VEGF。

1.2.3 细胞鉴定 每天在倒置相差显微镜下观察平面培养的细胞形态及数量变化,分别取第1、4、7、20天细胞进行细胞爬片,分别检测CD133及Ⅷ因子表达。

1.2.4 三维模型的观察及鉴定 取第3、6、9、12天的凝胶块,在单层细胞上下的凝胶内每孔随机选5个不同层面观察细胞数目及条索数,并将凝胶取出洗涤固定后切割成1 mm窄条,从横纵面观察。另将胶原石蜡包埋切片,检测eNOS-3和ET-1的表达,以细胞内出现棕黄颗粒为阳性反应,显色时间均为5 min,洗涤后苏木精轻度复染。脱水、透明、树脂封片。以与周围组织明显区别的1个棕黄色染色细胞或细胞丛为1个微血管,只要结构不相连,其分支结构也可作为1个血管,染色模糊或分辨不清者不计入内。

1.3 统计学分析

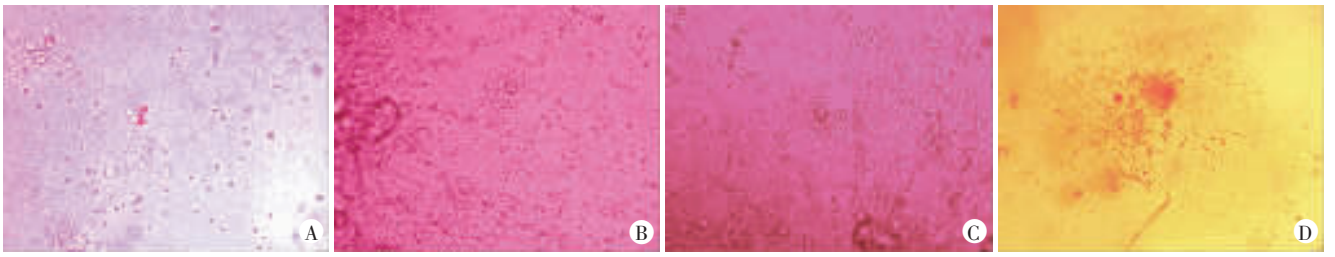
数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 14.4统计软件进行t检验和方差分析。

2 结果

2.1 外周血来源的内皮祖细胞体外培养和扩增

被分离的外周血单个核细胞在培养48 h后出现贴壁,培养第4天可见梭形细胞和细胞簇,培养第7天,梭形细胞增多,培养至第10天,贴壁细胞接近融合,呈“毛细血管”样排列,培养21 d左右接近融合并且呈典型的鹅卵石样排列。

作者简介:施 森,男,湖北省大悟县人,硕士,医师,主要从事周围血管外科基础与临床方面的研究。E-mail:shisende@yahoo.com.cn
通信作者:宋 丽,E-mail:shisen80@163.com
收稿日期:2008-12-22;修回日期:2009-03-05



A:培养第3天,网状结构稀疏、不完整; B:培养第6天,管状结构增多,管腔小,呈放射状排列; C:培养第9天,管状结构明显增多,呈放射状,管腔较前增粗; D:培养第12天,管状结构明显减少或消失,管腔闭塞

图1 实验组不同培养时间内皮祖细胞三维血管新生模型观察 (倒置相差显微镜×200)

2.2 细胞鉴定

免疫组化染色法鉴定贴壁内皮细胞的标志CD133和Ⅷ因子,可见外周血来源的第1、4、7天CD133表达呈阳性,且阳性细胞数逐渐增加,第20天明显降低。Ⅷ因子阳性细胞则于第4天开始逐渐增加。

2.3 三维模型观察

倒置相差显微镜观察对照组细胞生长慢、出芽慢,管状结构细小,向胶原内浸润的深度浅,网状结构稀疏、不完整;VEGF实验组细胞生长快,向胶原基质内浸润速度快、出芽快,管状结构粗大,可形成贯穿胶原的三维网状结构(图1)。在第3、6、9、12天每孔选5个不同层面观察细胞数目及条索数。第3~9天血管数量呈递增趋势,第9天后数量未见增加且出现原有血管团萎缩,VEGF实验组与对照组新生血管数目比较差异有统计学意义($P<0.01$,表1)。

表1 大鼠外周血内皮祖细胞培养不同时间三维模型血管新生数目 ($\bar{x}\pm s$)

组别	第3天	第6天	第9天	第12天
VEGF实验组	8.89±1.90[a]	14.00±2.45[a]	31.10±7.41[a]	30.56±7.54[a]
对照组	0.67±0.71	1.44±0.88	1.89±1.27	8.11±1.62

a: $P<0.01$,与对照组比较

2.4 三维模型鉴定及分析

取第3、6、9、12天的凝胶块,以石蜡包埋切片,检测eNOS-3和ET-1的表达,可见ET-1、NOS-3表达阳性,表明模型具有分泌功能,具有成熟血管特性。

3 讨论

内皮祖细胞有着参与新生血管的形成,具有高增殖能力以及和成熟血管内皮细胞相似的特性,而且取材方便,因此是组织工程血管、血管移植物再内皮化以及构建组织工程器官血管网络种子细胞的理想来源。而VEGF等因子在其促血管新生中则有着重要作用[2]。

VEGF以它较强的促血管形成作用而日益受到人们关注。VEGF或bFGF诱导形成的血管有相似的直径、清蛋白渗透性和红细胞通过率[3]。研究证明,体外培养种VEGF浓度与内皮祖细胞增殖率呈正相关,0~9 ng/ml的VEGF浓度变化可以使内皮祖细胞增殖数量提高4倍[1]。本研究体外血管生成实验显示,VEGF显著促进EPC形成小管的数量与立体生长程度。另外,包被了贴壁因子的培养皿细胞贴壁及增殖均比未包被的多。这说明贴壁因子、血管内皮生长因子等对于体外培养EPC有很重要的作用。

VEGF能特异性地直接作用于血管内皮细胞,是促进血管生成的重要因子[4,5]。不同的VEGF结合相应的内皮细胞上跨膜受体,引起后者的构象变化,启动不同的信号通路。其中,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)及其所引发的磷酸化级联反应是非常重要的环节。VEGF可诱导内皮细胞ETS-1的表达增加,MAPK在此途径中起作用,但并非是唯一的途径。

血管新生为实体瘤生长和转移所必需,对VEGF诱导的内皮细胞信号通路进行深入的研究,可以为抗肿瘤血管新生治疗提供更多的新靶点[6],我们也可以选择切断VEGF诱导ETS-1信号通路上的某一个信号分子如MAPK,来达到抑制血管新生的目的。但由于细胞内的信号转导是一个复杂的信息网络,只有对机制进行更深入的研究,才能在实践中加以更有效的利用。

参考文献:

[1] Kaushal S, Amiel G E, Guleserian K J, *et al*. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded *ex vivo*[J]. Nat Med, 2001, 7(9): 1035-1040.

[2] 施 森, 何延政, 刘 勇, 等. 外周血来源内皮祖细胞三维血管新生模型的建立及其特性分析[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2009, 16(2): 119-123.

[3] Enomoto S, Yoshiyama M, Omura T, *et al*. Microbubble destruction with ultrasound augments neovascularisation by bone marrow cell transplantation in rat hind limb ischaemia[J]. Heart, 2006, 92(4): 515-520.

[4] 叶 兰, 徐晓玉, 李荣亨, 等. 三棱、莪术含药血清对培养的人脐静脉血管内皮细胞生长和VEGF表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(2): 121-124.

[5] 李秋玲, 张博爱, 朱红灿, 等. 脑缺血大鼠脑组织中Survivin、血管内皮生长因子、微血管密度检测[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2008, 43(3): 509-512.

[6] Tsuchiya T, Nakahama K, Asakawa Y, *et al*. The reduction in pigment epithelium-derived factor is a sign of malignancy in ovarian cancer expressing low-level of vascular endothelial growth factor[J]. Gynecol Endocrinol, 2009, 25(2): 104-109.

(编辑 龙 亮)