维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)08-0808-04

人卵巢癌微血管内皮细胞对 PDGF-BB 刺激的反应

杨 鹰,阎 萍,韩 静,连 艳

(第三军医大学新桥医院妇产科,重庆 400037)

【摘 要】目的:探讨人卵巢癌微血管内皮细胞与 HUVEC 在生物学特性及对血管生成因子刺激反应的差异。方法:分离纯化人卵巢癌微血管内皮细胞,以 HUVEC 为对照,用 PDGF-BB 刺激两种内皮细胞,利用免疫细胞化学和 RT-PCR 技术观察刺激后两种内皮细胞增殖、PCNA 及 VEGF 表达的变化。结果:PDGF-BB(20ng/ml)能促进两种内皮细胞的增殖、PCNA 和 VEGF 的表达,人卵巢癌微血管内皮细胞增殖和 PCNA 表达增强的幅度弱于 HUVEC;而 VEGF 蛋白及 mRNA 表达增强的幅度高于 HUVEC($P<0.05$)。结论:人卵巢癌微血管内皮细胞与 HUVEC 对 PDGF-BB 刺激的反应有显著差异,为深入研究卵巢癌血管生成机制和抗血管生成治疗提供了实验模型。

【关键词】卵巢癌;血管内皮细胞;细胞培养;血小板源性生长因子

【中国图书分类法分类号】R737.31 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-04-30

The responses of microvascular endothelial cells from human ovary carcinoma to PDGF-BB

YANG Ying, et al

(*Department of Obstetrics and Gynecology, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the difference of biological characteristics and responses to PDGF-BB between human ovarian carcinoma-derived microvascular endothelial cells and human umbilical vein endothelial cells. *Methods*: The ovarian carcinoma-derived microvascular endothelial cells were isolated and purifed from ovarian carcinoma tissues. Compared to the human umbilical vein endothelial cells, the biological characteristics and responses to PDGF-BB were observed in OdMEC for the changes of growth, PCNA and VEGF expression. *Results*: 20ng/ml PDGF-BB could enhance both kinds of endothelial cells to proliferate, express PCNA and VEGF. The proliferation and PCNA protein expression in HUVEC were augmented more significantly than those in OdMEC, the protein and mRNA of VEGF expression were augmented more significantly than those in HUVEC. *Conclusion*: The responses of OdMEC to PDGF-BB were significantly different from those of HUVEC, which provides experiment basis for research on ovarian carcinoma vascularization and antiangiogenesis therapy.

【Key words】 Ovarian carcinoma; Vascular endothelial cell; Cell culture; Platelet-derived growth factor

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,但长期以来由于肿瘤源性微血管内皮细胞(Tumor-derived microvascular endothelial cells, TdMEC)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 TdMEC 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。血小板源性生长因子(Platelet-derived growth factors, PDGF)是胸腺嘧啶核苷的磷酸化酶,能刺激人的内皮细胞增殖、趋化。人卵巢癌细胞及其来源的内皮细胞均可表达 PDGF 及其受体[1]。因此,我们在分离培养人卵巢癌微血管内皮细胞(Ovarian carcinoma-derived microvascular endothelial cell, OdMEC)并观察其生物学特性的基础上,以人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)为对照,通过观察 PDGF-BB 对 OdMEC 和 HUVEC 生长、PCNA 和 VEGF 表达的影响,初步探讨两种内皮细胞的生物学特性及对血管生成因子刺激反应的差异。

作者介绍:杨 鹰(1963-),男,硕士,副教授,主要研究方向:妇科肿瘤方面的研究。

基金项目:第三军医大学校管青年科研基金资助项目(2002D076)。

1 材料与方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 主要试剂

DMEM 培养粉、内皮细胞专用培养液:Gibco;优等胎牛血清:Hyclone;I 型胶原酶:Roche;dNase Ⅰ: 华美生物;Percoll:Amersham;MTT:Amresco;bFGF、EGF、PDGF-BB:CytoLab;Ⅷ相关抗原(FⅧ-R Ag)单克隆抗体:福州迈新;鼠抗 PCNA 单抗工作液、鼠抗 VEGF 单抗工作液、SP 试剂盒:北京中杉;逆转录试剂盒:Fermentas;PCR 试剂盒:TOYOBO。

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,病理诊断符合卵巢癌。

取自第三军医大学新桥医院妇产科行剖腹产的正常足月新生儿的脐带。

1.3 方 法

1.3.1 人卵巢癌微血管内皮细胞的原代培养与传代培养 参照 Alessandri 和蒋雪峰[2-4]等的方法,略作改进。无菌条件下,取卵巢癌组织,机械法剪碎,0.25%胰酶消化 30min,洗涤,收集沉淀,0.5mg/ml Ⅰ型胶原酶消化 10min 后, 加入 0.02% dNase Ⅰ,继续消化 1~1.5h,200 目(φ76μm)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℃2000r/min 离心 20min,取液面下约 2cm 处的云雾状细胞层,洗涤,弃上清,加入 DMEM 完全培养液 (含有 15%优等胎牛血清、5ng/ml bFGF、20ng/ml EGF、20U/ml 肝素、5μg/ml 氢化考的松、100U/ml 青霉素及 100U/ml 链霉素),稀释成 4×10^5/ml,接种于 100ml 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 1h 去除成纤维细胞,48h 后换液 1 次,以后每 3 天换液 1 次,直至细胞融合。

待细胞生长接近融合,在倒置显微镜下刮去已贴壁的杂细胞。0.25%胰酶(含 0.02%EDTA) 消化,按 1:2~3 比例进行传代培养。

1.3.2 HUVEC 的原代培养与传代培养 采用第三军医大学西南医院烧伤研究所建立的胰蛋白酶灌注消化法。取 25~30cm 脐带,0.25%胰酶灌注消化,10min 终止消化, 离心收集细胞,用内皮细胞专用培养液(含 10%优等胎牛血清)制成细胞悬液, 接种于 100ml 培养瓶中, 置于放入 37℃,5%$CO_2$95%空气饱和湿度培养箱中培养。24h 后换液 1 次,以后每 2~3 天全量换液 1 次,直至细胞融合。

待细胞生长接近融合,0.25%胰酶消化, 按 1: 2~3 比例进行传代培养。

1.3.2 PDGF-BB 对细胞增殖的影响 将第二代细胞传代后,以 3×10^4/ml 的密度接种于 96 孔板培养,每个时间点设 6 个复孔,细胞贴壁后,换含不同浓度 PDGF-BB(0、5、10、20、50ng/ml)的培养液(含 10%优等胎牛血清),继续培养 24h,然后每孔内加入 5mg/ml 的 MTT 20μl,继续培养 4h,吸去培养液,加入 DMSO150μl,振荡 10min,在酶标仪上于 490nm 波长上测定光密度值(OD 值),用空白对照孔(只加培养液)调零。重复至第 7 天结束。以培养时间为横轴,平均 OD 值为纵轴绘制细胞生长曲线。

将第二代细胞传代后, 接种于放有预处理盖玻片的 24 孔板培养,细胞贴壁后,换含有 20ng/ml PDGF-BB 的培养液(含 10%优等胎牛血清),作用 5 天后终止培养。固定爬片,用 PCNA 单抗工作液行免疫细胞化学 SP 法染色,DAB 显色。阴性对照用 PBS 代替一抗,其余步骤不变。图像分析仪测定灰度值(OD 值)。

1.3.3 PDGF-BB 对细胞中 VEGF 表达的影响 20ng/ml PDGF-BB 作用 5 天后,S-P 法检测细胞中 VEGF 蛋白的表达。阴性对照用 PBS 代替一抗。图像分析仪测定 OD 值。

将第二代细胞传代后,以 5×10^5/ml 的密度接种于 100ml 培养瓶中, 倒置显微镜下观察细胞贴壁后, 换含有 20ng/ml PDGF-BB 的培养液(含 10%优等胎牛血清),作用 5 天后终止培养。对照组培养基中不含 PDGF-BB。提取细胞总 RNA,逆转录—聚合酶链式反应(RT -PCR)扩增 VEGF mRNA。所用引物情况:VEGF (上游 5'-GAG ACC CTG GTG GAC ACT TC -3'; 下游 5'-GTG CTG TAG GAA GCT CAT CTC TC-3'; 产物长度:210bp; 退火温度:59℃); 内参 GAPDH(上游 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'; 下游 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3';产物长度:452bp;退火温度:61.5℃)。

1.3.4 统计学方法 试验结果以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS 10.0 软件进行统计分析。同一时相点的实验组与对照组比较用配对 t 检验,$P<0.05$,判定为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞形态学观察

OdMEC 原代培养细胞接种 24h 后开始贴壁,8~10 天左右细胞融合成单层片状,呈短梭形或多边形;HUVEC 接种 12h 后开始贴壁,5~6 天细胞融合成单层片状,呈单层扁平多角形细胞(图 1、2)。显微镜下形成内皮细胞培养时典型的"铺路石样"外观。传代细胞生长快于原代培养细胞,OdMEC 平均 6~7 天传代 1 次,HUVEC 平均 4~5 天传代 1 次。两种细胞透射电镜下可见胞质中含有特征性的 W-P 小体;免疫细胞化学染色 FⅧ-R Ag 表达阳性。证明所获得的细胞具有内皮细胞属性。用 FⅧ-R Ag 单抗作免疫细胞化学染色检测细胞纯度 85%以上。本实验均采用 2 代以后的对数生长期细胞。

2.2 PDGF-BB 对细胞增殖的影响

在 OdMEC 组和 HUVEC 组,随着 PDGF-BB 浓度的增加,OD 值也增大。5ng/ml 对细胞无明显刺激作用,20ng/ml 达到最高点 ($P<0.05$),50ng/ml 与 10ng/ml 刺激作用相当。因此以 20ng/ml 作为后续实验的最佳刺激浓度(图 3)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

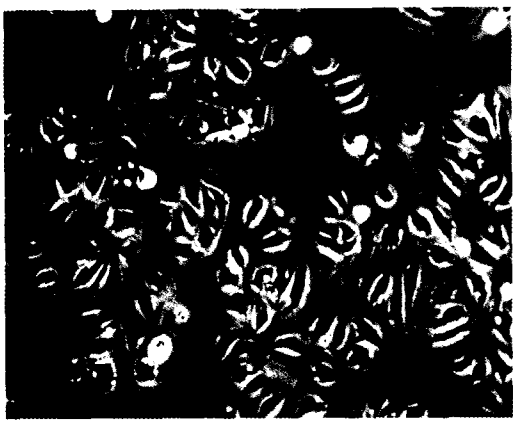


图 1 HUVEC 接种 5 天(200×)



图 2 OdMEC 接种 8 天(200×)

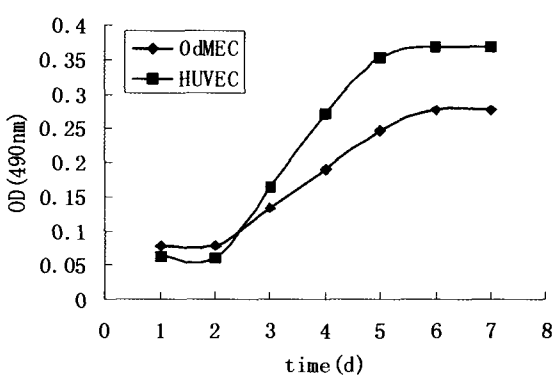


图 3 20ng/ml PDGF-BB 对两种内皮细胞生长的影响(OD 值)

PCNA 蛋白表达主要位于细胞核,呈棕黄色至深棕色,胞质未见染色。20ng/ml PDGF-BB 刺激后,两种细胞 PCNA 的表达显著增强,OdMEC 组 PCNA 表达增强的幅度明显低于 HUVEC 组 (见表 1,$P<0.05$)。

2.3 PDGF-BB 对 VEGF 表达的影响

VEGF 蛋白主要表达于胞质, 呈棕黄色至深棕色,胞核未见染色。20ng/ml PDGF-BB 作用于细胞后, 两种细胞 VEGF 的表达显著增强,OdMEC 组 VEGF 表达增强的幅度明显高于 HUVEC 组 (见表 1,$P<0.05$)。

表 1 20ng/ml PDGF-BB 对两种内皮细胞 PCNA、VEGF 表达的影响(OD 值)

	OdMEC		HUVEC	
	PCNA	VEGF	PCNA	VEGF
PDGF-BB	194.36 ± 15.69	181.45 ± 11.25	231.92 ± 20.75	191.11 ± 4.60
对照	174.75 ± 14.65	160.19 ± 13.87	194.05 ± 23.31	185.04 ± 5.10

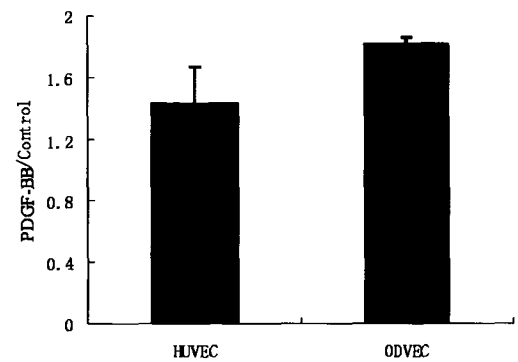


图 4 PDGF-BB 对两种内皮细胞 VEGF mRNA 表达的影响

RT-PCR 对细胞中 VEGF mRNA 表达的结果分析显示,20ng/ml PDGF-BB 刺激后, 两种内皮细胞 VEGF mRNA 的表达均增强(图 4),OdMEC 增强的幅度 (ODPDGF-BB 刺激组/OD 对照组=1.81±0.04)大于 HUVEC 组(ODPDGF-BB 刺激组/OD 对照组=1.43±0.23)($P<0.05$)。

3 讨 论

血管生成是指从已存在的微血管上芽生出新的微血管的过程。肿瘤血管新生使肿瘤获得进一步生长的能力,从而迅速生长并可发生转移。肿瘤血管新生离不开内皮细胞的激活、增殖及迁移。通常情况下,肿瘤血管新生时,其内皮细胞主要募集于周围成熟血管的内皮细胞[5]。肿瘤微血管内皮细胞受肿瘤类型和宿主微环境双重的影响, 其形态结构、功能及基因表达亦不相同[6]。

与正常血管内皮细胞相比,TdMEC 表达的基因有差异。肿瘤细胞产生的某些物质,诱导内皮细胞表达一些在正常组织无表达的靶向性分子,使其表型和功能发生改变[7]。St Croix 等[8]检测结肠癌来源的内皮细胞发现,正常组织与肿瘤组织来源的血管内皮细胞之间具有高度相关性,有许多共同的内皮

维普资讯 http://www.cqvip.com

细胞标志物(Pan-endothelial marker, PEM),但表达量存在差异。在 TdMEC 中有 46 种基因表达高于正常组织来源内皮细胞,33 种低于正常内皮细胞。亦有许多基因在肿瘤周围正常内皮细胞、TdMEC 及 HUVEC 的表达是不同的,某些基因在 TdMEC 及肿瘤周围内皮细胞中高表达,但在 HUVEC 中无表达或较少表达。以上研究结果说明,培养的正常内皮细胞并不能完全代替 TdMEC 的整体情况。

PDGF 是胸腺嘧啶核苷的磷酸化酶,是内皮细胞特异的有丝分裂原,能刺激人的内皮细胞增殖、趋化。PDGF 家族成员由四种不同基因编码的多肽链(A、B、C、D 链)组成,即 PDGF-AA,PDGF-AB,PDGF-BB,PDGF-CC 和 PDGF-DD[9,10]。人卵巢癌细胞及其来源的内皮细胞均可表达 PDGF 及其受体[1]。

有研究报到 PDGF-BB 能诱导内皮细胞的增殖、迁移、管样结构的形成和细胞存活[11]。本实验发现,PDGF-BB 能促进体外培养的 OdMEC 生长,呈剂量依赖性,PDGF-BB 20ng/ml 作用最强。PDGF-AA/BB 与受体结合后激活受体,导致参与抗凋亡机制的多个信号通路的上调[12]。PDGF-BB 对 OdMEC 的增殖的促进作用弱于 HUVEC,可能是由于在卵巢癌组织中,OdMEC 还受到 PDGF 以外其它刺激因子的作用,如 IL-8[13]。在 PDGF-BB(20ng/ml)作用下,OdMEC 中 VEGF 蛋白和基因的表达增高,且升高幅度大于 HUVEC,从而说明与正常内皮细胞相比,OdMEC 对 PDGF-BB 刺激的反应性更强。这两种细胞对 PDGF 刺激的反应性存在显著差异,其中的原因尚不清楚,可能与两种内皮细胞表面 PDGF 受体的种类及功能的不同有关。本实验为研究卵巢癌血管生成机制和抗血管生成治疗提供了实验基础。

参 考 文 献

[1] Apte SM,Bucana CD,Killion JJ,et al. Expression of platelet-derived growth factor and activated receptor in clinical specimens of epithelial ovarian cancer and ovarian carcinoma cell lines[J]. Gynecologic Oncology,2004;93(1):78-86.

[2] Alessandri G,Chirivi R GS,Castellani P,et al. Isolation and characterization of human tumor-derived capillary endothelial cells: role of oncofetal fibronection[J]. Lab Invest,1998;78(1):127-128.

[3] 蒋雪峰,白家驷,卞修武,等. 血管内皮生长因子诱导的胶质瘤源性微血管内皮细胞体外三维成型特性[J]. 中华病理学杂志,2005;34(9):579-582.

[4] Bian XW,Jiang XF,Chen JH,et al. Increased angiogenic capabilities of endothelial cells from microvessels of malignant human glioma[J]. Int Immunopharmacol,2006;6(1):90-99.

[5] Rafii S. Circulating endothelial precursors:mystery,reality and promise[J]. J Clin Ivest,2000;105(1):17-79.

[6] Hobbs SK, Monsky WL,Yuan F,et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels:Role of tumor type and microenviroment [J]. Proc Natl Acad Sci USA,1998;95(8):4607-4612.

[7] Mutuberria R,Satijn S,Huijbers A,et al. Isolation of human antibodies to tumor-associated endothelial cell markers by in vitro human endothelial cell selection with phage display libraries[J]. Journal of Immunological Methods,2004;287(1-2):31-47.

[8] St Croix B,Rago C,Velculescu V,et al. Genes expressed in human tumor endothelium[J]. Science,2000;289(5482):1197-1202.

[9] Gilbertson DG, Duff ME,West JW,et al. Platelet-derived growth factor C (PDGF-C),a novel growth factor that binds to PDGF alpha and beta receptor[J]. J Biol Chem.,2001;276(29):27406 -27414.

[10] Bergsten E,Uutela M,Li X,et al. PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF β-receptor[J]. Nat Cell Biol,2001;3(5):512-516.

[11] Sano H,Ueda Y,Takakura N,et al. Blockade of platelet-derived growth factor receptor-beta pathway induces apoptosis of vascular endothelial cells and disrupts glomerular capillary formation in neonatal mice[J]. Am J Pathol,2002;161(1):135-143.

[12] Pietras K,Sjoblom T,Rubin K,et al. PDGF receptors as cancer drug targets[J]. Cancer Cell,2003;3(5):439-443.

[13] Kassim SK,El Salahy EM,Fayed ST,et al. Vascular endothelial growth factor and interleukin-8 are associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients[J]. Clin Biochem,2004;37(5):363-369.

(上接第 801 页)

7650-7661.

[5] Boronat M A,Garcia-Fuster M J,Garcia-Sevilla JA. Chronic morphine induces up-regulation of the pro-apoptotic Fas receptor and downregulation of the anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein in rat brain[J]. British Journal of Pharmacology,2001;134:1263-1270.

[6] Maldonado R,Dauge V,Callebert J,et al. Fournieplete inhibitors of enkep- halindegrading enzymes on morphine withdrawal syndrome[J]. Eur J pharmacol,1989;165:199-207.

[7] 贲长恩,李叔庚,主编.组织化学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001.858-900.

[8] 蔡文琴,王伯云.实用免疫细胞化学与原位分子杂交技术[M]. 成都:四川科学技术出版社,1994.46-196.

[9] 包新民,舒斯云主编.大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京:人民卫生出版社,1991.23-85.

[10] Zamzami N,Brenner C,Marzo I,et al.Subcellular and submitochondrial ode of action of Bcl-2-like oncoproteins[J]. Oncogene,1998;16:2265.

[11] Singhal PC. Morphine promotes apptosisin Jurkat cells [J]. Leukoc Biol,1999;66(4):650.

[12] Zhang Y,Wu GC,He QZ,et al. Effect of morphine and electro-acupuncture(EA)on apoptosis of thymocytes[J]. Acupunct Electrother Res,2000;25(1):17-26.

[13] Torres G,Horowitz JM. Drugs of abuse and brain gene expression[J]. Psychosomatic Med,1999;61:630-650.