维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2005)03 - 0369 - 04

肿瘤基质血管内皮细胞血管形成能力研究

朱红梅[1], 汤为学[2], 张大志[3]

(1. 重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010;2. 重庆医科大学病理生理学教研室,重庆 400016;
3. 重庆医科大学第二临床学院感染病科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨肿瘤基质血管内皮细胞的血管形成能力。方法:对卵巢癌细胞 SKOV3 培养上清液诱导人内皮细胞 ECV304 获得能稳定生长的 ECV304 - SKOV3 细胞,用免疫细胞化学测定其血管形成因子的表达、PT - PCR 测定其端粒酶活性、双室联合培养测定其游走能力与管腔形成能力,并分析其蛋白质合成能力、粘贴能力。并与亲代细胞 ECV304 比较。结果:ECV304 - SKOV3 细胞蛋白质合成能力、端粒酶活性强于亲代细胞 ECV304($P<0.001$),但粘贴能力减弱($P<0.001$)。表达 bcl - 2、基质金属蛋白酶 - 9(matrix metalloproteinase 9, MMP - 9)增强($P<0.05$),而粘合素(tenascin, TN)减弱($P<0.05$)。ECV304 - SKOV3 细胞较 ECV304 细胞的游走能力强 2.10 倍,差异非常显著($P<0.001$),管腔形成能力也明显增强,平均每视野管腔数分别为(12.4 ± 1.517)条和(6.4 ± 0.894)条($P<0.01$),管腔长分别为(262.17 ± 49.52)μm 和(137.34 ± 18.69)μm ($P<0.01$)。结论:肿瘤基质血管内皮细胞存活能力增强,表达多种细胞因子与血管形成因子增强,相应地游走能力与管腔形成能力明显增强。

【关键词】肿瘤;内皮细胞;血管;血管形成
【中国图书分类法分类号】R73 - 3 【文献标识码】A 【收稿日期】2004 - 09 - 20

Study on the angiogenic ability of tumor vascular endothelial cells

ZHU Hongmei, et al

(*Institute for Viral Hepatitis, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the angiogenic ability of vascular endothelial cells in solid tumors. *Methods*: Immunocytochemistry, reverse transcription polymerase chain reaction (PT - PCR), and two - well co - culture system were used to detect the expressions of matrix metalloproteinase 9(MMP - 9), transforming growth factor - β1 (TGF - β1), tenascin(TN) and bcl - 2, telomerase activity, and their ability of both migration and tube formation of ECV304 - SKOV3 cells respectively, which, as the cell model, had been established in our laboratory before. Then their abilities of protein synthesis and adhesion were analysed. *Results*: The ability to synthesize proteins and telomerase activity was enhanced($P<0.001$). Adhesion potential of ECV304 - SKOV3 cells decreased ($P<0.001$). The expressions of MMP - 9 and bcl - 2 in ECV304 - SKOV3 cells increased ($P<0.05$), while TN decreased ($P<0.05$), as compared with that of ECV304 cells. The migratory capability of ECV304 - SKOV3 cells was 2.10 times greater than that of ECV304 cells ($P<0.001$). ECV304 - SKOV3 cells formed tubular structures more and longer than did ECB304 cells, when co - cultured with SKOV3 cells ($P<0.01$). *Conclusion*: The results suggest that ECV304 - SKOV3 cells, compared with parental cells ECV304, survive longer, express and secrete various cytokines and angiogeneic factors stronger, and has greater ability to migrate and form vascular structure.

【Key words】Tumor; Endothelial cell; Vasculature; Angiogenesis

血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是最直接、最重要的促血管形成因子,它可通过多种信号传导途径促进肿瘤基质内皮细胞存活、增殖、游走与重塑基质形成管型[1,2]。人卵巢癌细胞 SKOV3 来自有腹水的卵巢癌病人,能表达并分泌 VEGF 入其上清液[3]。在用其培养上清液诱导人内皮细胞 ECV304 获得肿瘤基质血管内皮细胞模型 ECV304 - SKOV3 的基础上,分析其存活、游走、管腔形成能力。

作者介绍:朱红梅(1975 -),女,讲师,硕士,
主要研究方向:肿瘤病理生理。

1 材料与方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 细胞系

人卵巢癌细胞系 SKOV3 由本室提供，人脐静脉内皮细胞系 ECV304 由本校张诩博士惠赠，肿瘤基质血管内皮细胞模型 ECV304－SKOV3 由前期实验建立。

1.2 细胞培养

ECV304－SKOV3 细胞用 SKOV3 培养上清液与 20% 小牛血清（bovine serum，BS）DMEM－F_{12}完全培养基 1∶1（v/v）制成的培养液培养，SKOV3、ECV304 细胞分别用含 10% BS 的 DMEM、10% BS 的 DMEM－F_{12}培养液培养。

1.3 细胞总蛋白测定

按考马司亮蓝 G－250 法测标准液与样品中的蛋白含量，绘制标准曲线，求出线性方程与样品蛋白浓度。

1.4 计数与四甲基偶氮唑盐（MTT）法检测细胞的粘贴能力

调整 ECV304－SKOV3 与 ECV304 细胞浓度为 1×10^5/ml；每孔种 2ml 细胞悬液入 6 孔培养板内，置 37℃、5% CO_2 饱和湿度孵箱内培养；于 30min、60min、90min、120min 分别取出 3 孔，吸出培养液入小试管中，再用 PBS 轻洗 2 次，1000r/min 离心 5min，用台盼蓝拒染法进行活细胞计数，每管计数两次，取均值；同时 6 孔板中加入无血清培养液 800μl 继续培养。于 120min 时一起加 80μl MTT，培养 4h。MTT 法设 120min 对照组 3 孔。计算粘贴率：

计数法：

$$\text{粘贴率}=\frac{\text{种入细胞数}-\text{悬浮细胞数}}{\text{种入细胞数}}\times100\%$$

MTT 法：

$$\text{粘贴率}=\frac{At}{A_{对照}}\times100\%\ (t=30,60,90,120\text{min})$$

1.5 免疫细胞化学法（SP）检测基质金属蛋白酶－9（matrix metalloproteinase 9，MMP－9）、粘合素（tenascin，TN）、bcl－2、转化生长因子－β1（transforming growth factor －β1）的表达

bcl－2 多克隆抗体购自北京中山生物有限公司；MMP－9，TN、TGF－β1 单克隆抗体购自福州迈新生物技术发展公司。按试剂盒说明书操作，阴性对照以 PBS 代替一抗。胞浆黄（棕）色着色为阳性，按着色强弱分为 4 个等级：无着色 0 分，淡黄色 1 分，棕黄色 2 分，棕褐色 3 分，按 HSCORE[4] = $\sum$Pi(i+1)(i=o,1,2,3；Pi 表示评分 i 的比例）计算 HSCORE 得分。

1.6 端粒酶活性测定

端粒酶检测试剂盒购自德国 Promega 公司，按试剂盒说明书操作。结果判定：阴性对照 A<0.2，阳性对照 A>1.0 为有效测定。

1.7 内皮细胞游走能力测定

每孔种 1×10^5/ml 的 SKOV3 细胞 2ml 入 6 孔培养板内，培养 5h 后细胞贴壁，吸去上清液，PBS 洗 2 次，每孔加入 0.5% BS DMEM－F_{12}2ml 于 6 孔板；18h 装配小室（购自法国 Millipore 公司），用 0.5% BS DMEM－F_{12}调 ECV304－SKOV3 与 ECV304 细胞浓度为 5×10^5/ml，吸 0.4ml 细胞悬液入小室，继续培养；6h 后，用棉签试去小室上面的细胞，PBS 洗 3 次，固定，H&E 染色，取下微孔滤膜，反贴于载玻片上。重复 3 孔。200 倍光镜下计数 10 个视野的细胞，取均值。

1.8 内皮细胞管腔形成能力测定

每孔种 2ml 1×10^5/ml 的 SKOV3 细胞悬液或 2ml 10% BS DMEM 培养液（空白）入 6 孔培养板，置 37℃、5% CO_2 饱和湿度孵箱内培养；第 2 天去上清液，PBS 洗 2 次，装配内铺 Matrige（40μl/孔）的小室（均购自法国 Millipore 公司）；用 0.5% BS DMEM－F_{12}调整 ECV304－SKOV3 与 ECV304 细胞浓度为 5×10^5/ml；设 ECV304－SKOV3/SKOV3（室上/室下）、ECV304－SKOV3/空、ECV304/SKOV3、ECV304/空共 4 组，加 0.4ml 细胞悬液入小室；加 0.5% BS DMEM－F_{12} 2ml 每孔入 6 孔板，继续培养，每组重复 3 孔。每日在倒置显微镜下观察细胞的生长及形态变化，换液 1 次；第 4 天取出小室，孔滤膜 PBS 洗 3 次，固定，HE 染色，取下微孔滤膜，贴于载玻片上；100 倍光镜下随机选取 10 个管型分布均匀的视野，计数管腔数，取均值，并用医学图像分析系统随机测定 10 个管腔的长度，取均值。

1.9 统计检验

采用 t 检验、方差分析、线性相关分析。数据用 SAS 统计软件包分析。

2 结 果

2.1 细胞总蛋白测定

标准液各浓度与光密度值 A 高度相关（$r=0.9940$，$P<0.01$）。一元线性方程为 $y=0.6879x+0.0229$，标准曲线如图 1 所示。在该条件下测得 1×10^6 个 ECV304－SKOV3 细胞蛋白浓度明显高于亲代细胞 ECV304，分别为（0.665±0.019）mg/ml 和（0.503±0.026）mg/ml（$t=-12.2465$，$P<0.001$）。标本品 A 值在标准曲线直线范围内，结果可靠。

2.2 细胞的粘贴能力

随着时间延长，细胞的粘贴能力增加，ECV304

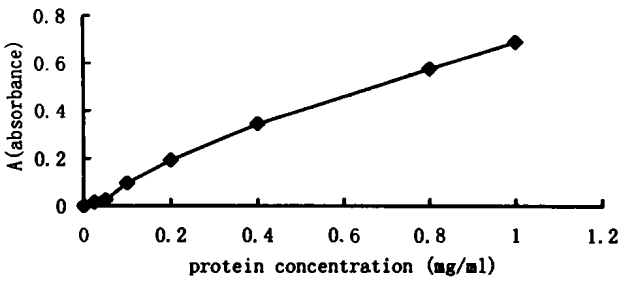


图 1 细胞总蛋白的标准曲线

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 计数法测得 ECV304、ECV304 - SKOV3 细胞的粘贴率($\bar{x} \pm s$, %)

组别	30min	60min	90min	120min
ECV304	54.82 ± 2.87	70.83 ± 3.74	93.34 ± 0.73	95.37 ± 1.25
ECV304 - SKOV3	14.53 ± 9.01	22.23 ± 8.58	73.15 ± 3.51	81.12 ± 1.26

$F = 192.99, P < 0.001$

表 2 MTT 法测得 ECV304、ECV304 - SKOV3 细胞的粘贴率($\bar{x} \pm s$, %)

组别	30min	60min	90min	120min
ECV304	52.98 ± 2.68	67.65 ± 3.97	89.68 ± 0.87	93.16 ± 2.27
ECV304 - SKOV3	14.08 ± 1.34	20.25 ± 3.08	69.26 ± 2.85	78.45 ± 4.37

$F = 390.59, P < 0.001$

表 3 ECV304、ECV304 - SKOV3 细胞表达 MMP - 9、TGF - β1、TN、bcl - 2 的 HSCORE 得分($\bar{x} \pm s$)

细胞组别	视野数	MMP - 9	TGF - β1	TN	bcl - 2
ECV304	10	2.348 ± 0.112	2.152 ± 0.044	1.872 ± 0.186	2.712 ± 0.080
ECV304 - SKOV3	10	2.458 ± 0.086△	2.184 ± 0.051	1.696 ± 0.163△	2.802 ± 0.069△

△ $t \geqslant 2.2473, P < 0.05$

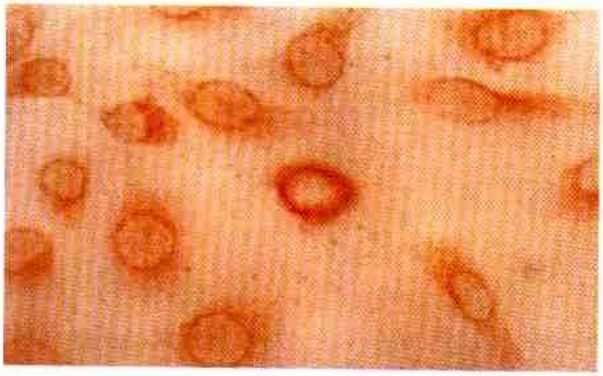


图 2 ECV304 细胞阳性表达 MMP - 9 DAB ×400

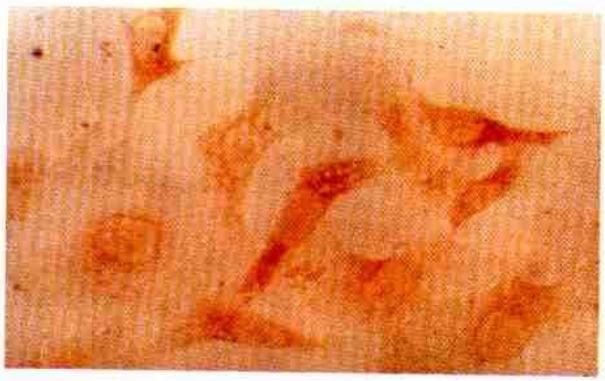


图 3 ECV304 - SKOV3 细胞阳性表达 MMP - 9 (DAB ×400)

细胞比相应的 ECV304 - SKOV3 细胞增加更明显(表 1、2)。

2.3 细胞 MMP - 9、TGF - β1、TN、bcl - 2 的表达

ECV304、ECV304 - SKOV3 细胞中等强度表达 MMP - 9,后者稍强($t = 2.4671, P < 0.05$),阳性率分别为 95%、96%(图 2,3)。表达 TGF - β1 差异不明显,阳性率分别为 91.2%、92.2%。表达 TN 很弱,均以弱阳性为主,阳性率分别为 70.4%、64%,ECV304 - SKOV3 细胞的表达更弱($t = 2.2473, P < 0.05$)。表达 bcl - 2 强阳性,均 100% 表达,ECV304 - SKOV3 明显强于亲代细胞 ECV304($t = 2.7038, P < 0.05$)。其 HSCORE 得分见表 3。

2.4 端粒酶活性测定

ECV304 - SKOV3 与 ECV304 细胞的端粒酶活性分别为 0.778 ± 0.011 和 0.692 ± 0.014,较亲代细胞明显增加($t = -25.2990, P < 0.001$)。(阴性对照 $A = 0.02$,阳性对照 $A = 1.07$)。

2.5 内皮细胞的游走能力

经双室联合培养系统测得 ECV304 - SKOV3 细胞较 ECV304 细胞的游走能力强 2.10 倍,平均每视野游走细胞数为(61.4 ± 10.4)个和(19.8 ± 1.9)个,差异非常显著($t = 8.77, P < 0.0001$)。

2.6 内皮细胞管腔形成能力

在下室无 SKOV3 细胞时,上室的 ECV304 细胞呈卵石样排列;ECV304 - SKOV3 细胞呈巢状样排列,可见细胞变长,首尾相连(图 4)。在有 SKOV3 细胞时,在倒置显微镜下第 2 天可隐约观察到变长的细胞及第 3 天蜂巢样堆积的细胞。第 4 天可明显见到管腔,管腔形成能力 ECV304 - SKOV3 细胞较 ECV304 细胞增强,平均每视野管腔数分别为(12.4 ± 1.517)条和(6.4 ± 0.894)条($t = 6.919, P < 0.01$),管腔长分别为(262.17 ± 49.52)μm 和(137.34 ± 18.69)μm($t = 6.8940, P < 0.01$),见图 5 与图 6。

3 讨 论

维普资讯 http://www.cqvip.com

肿瘤血管生成对肿瘤的发展(生长、侵袭与转移)有决定性作用,它运输营养物质与排除代谢产物,且肿瘤基质血管内皮细胞分泌促进肿瘤细胞生长的生长因子与蛋白酶增加肿瘤细胞入血液循环系统进行血源转移的机会[5]。

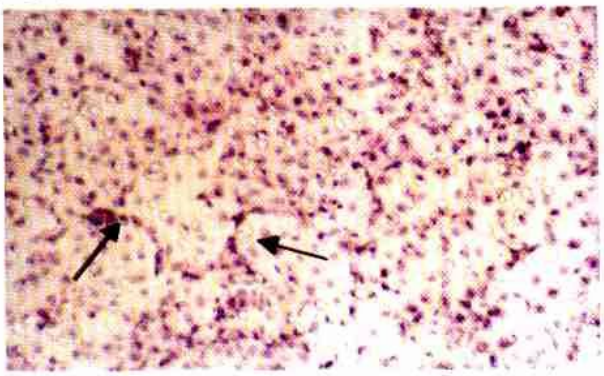


图 4 无 SKOV3 细胞时 ECV304 - SKOV3 细胞首尾相连 (HE×100)

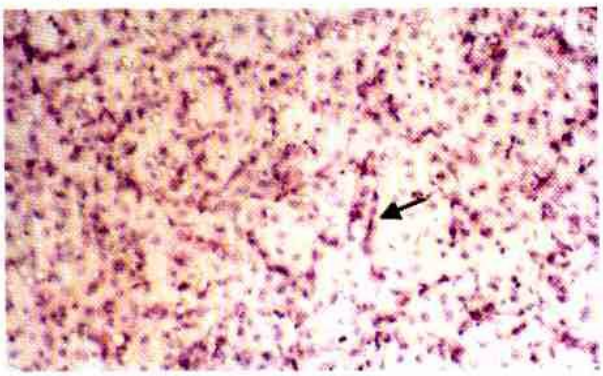


图 5 有 SKOV3 细胞时 ECV304 细胞管腔形成情况 HE×100

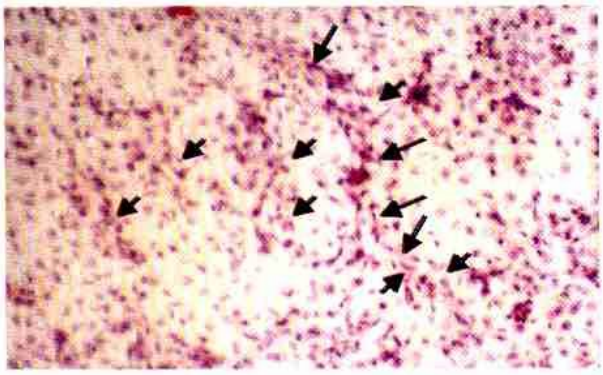


图 6 有 SKOV3 细胞时 ECV304 - SKOV3 细胞管腔形成情况(HE×100)

肿瘤基质血管内皮细胞存活能力增强是肿瘤血管形成的前提。我们发现 ECV304 - SKOV3 表达端粒酶活性与 bcl - 2 强于 ECV304,提示 ECV304 - SKOV3 细胞存活、血管形成能力增强,这可能与它受到培养液中来自 SKOV3 分泌的 VEGF 作用有关,它是肿瘤基质血管内皮细胞的存活因子[6]。Pallini 等[7]报道在脑部星形细胞瘤发展过程中,内皮细胞表达人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, HTERT)mRNA 随星形细胞瘤分级增加而增加。

ECV304 - SKOV3 的游走能力较 ECV304 增强,这可能与它的粘贴能力降低(黏附实验)和黏合素 TN 表达降低有关,也可能与 VEGF 通过 P38 通路刺激内皮细胞游走有关[8]。这些都利于它芽生形成管型,因此在与 SKOV3 联合培养时管腔形成能力(管腔数与管腔长度)明显强于 ECV304。这一方面因为它受到血管生成因子 VEGF 的作用,另一方面它可能已经发生类似肿瘤微环境下基质血管内皮细胞的表型变化,实验发现它表达 MMP - 9 增强,它可使内皮细胞转为血管生成表型[9]。并且 ECV304 - SKOV3 细胞在管腔形成方面有一定的主动性,在无 SKOV3 细胞时,ECV304 - SKOV3 细胞变长、巢状样分布,而 ECV304 仍呈上皮样排列。卵巢癌是高度血管化的肿瘤,其关键的血管形成因子 VEGF 存在自分泌、旁分泌作用。ECV304 - SKOV3 细胞自分泌某些血管形成因子增强,进一步证实它表型发生变化。Croix 等[10]发现肿瘤基质血管内皮细胞有 79 个异常转录子,其中 36 个上调至少 10 倍,包括 7 个参与胞外基质形成与重塑。

ECV304 - SKOV3 细胞表型发生变化,具有肿瘤基质血管内皮细胞某些特性,其存活、游走、管腔形成能力增强,与肿瘤细胞相互作用促进肿瘤发展。

参 考 文 献

[1] Huss WJ, Hanrahan CF, Barrios RJ, et al. Angiogenesis and prostate cancer: identification of a molecular progression switch [J]. Cancer Res, 2001; 61(6): 2736 - 2743.

[2] Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, et al. Vascular endothelial growth factor B(VEGF - B) binds to VEGF receptor - 1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998; 95(20): 11709 - 11714.

[3] Hu YL, Tee MK, goetzl EJ, et al. Lysophosphatidic acid induction of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells [J]. J Natl Inst, 2001; 93(10): 762 - 768.

[4] Harrington DJ, Lessey BA, Rai V, et al. tenascin is differentially expressed in endometrium and endometriosis [J]. J Pathol, 1999; 187(2): 242 - 248.

(下转第 479 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

传统的 ASP 并发 ALI/ARDS 的治疗常规需气管插管或气管切开机械通气,用 PEEE(呼吸末正压)呼吸模式治疗。NIPPV 的应用,不仅可达到与有创性机械通气的治疗效果;而且患者痛苦少,患者家属都易于接受,患者可自主排痰,不影响进食与声带功能,可方便地用语言与外界交流。NIPPV 因无需建立人工气道,可以随时给病人试用和撤除,容易被误认为是简单的人工通气方式。实际上,NIPPV 对医务人员的要求更高,它需要病人的合作和强调病人的舒适感,因此要向病人讲述治疗的目的以及连接和拆除的方法,开始应用的 4～8h 需要有专人负责治疗和监护,指导病人有规律地放松呼吸,消除恐惧心理,使病人能够配合和适应,也有利于紧急情况下(如:咳嗽、吐痰或呕吐时)患者能够迅速拆除连接,提高安全性和依从性,这点是非常重要的。当病人适应治疗后或者病情改善后,可以降低监护的强度。NIPPV 常见的不良反应(并发症)有胃胀气、口咽干燥、鼻肌部皮肤压伤、排痰障碍、不耐受、恐惧等,因此护理过程中首先要作好病人的心理护理及上呼吸机前给病人作好合适的教育是避免恐惧和不耐受以及胃胀气的主要方法;治疗过程中加强监护及床旁指导病人配合治疗、加湿化器以及协助病人排痰保持气道通畅、合理地调整鼻面罩的位置及松紧度等是解决不良反应的有效措施。本组 29 例病人除有明显口咽干燥(与 ASP 需禁水有关),另外有 5 例发生胃胀气,2 例鼻面部皮肤压伤,其余无并发症发生。随着临床实践的深入,无创通气的有效性、安全性及可依从性必将得到进一步的肯定。

参 考 文 献

[1] Andrulli A, Perri F, Annese V. Guidelines for treatment of acute pancreatitis[J]. Gut, 1999;44:579－580.

[2] 中华医学会呼吸分会. 急性肺损伤/急性呼吸道窘迫综合征的诊断标准[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2000;23(4):203.

[3] 曾凤微. 无创性双水平气道正压呼吸机的临床应用[J]. 华夏医学, 2002;15(5):642－643.

(上接第 372 页)

[5] Vacca A, Ribatti D, Pellegrino A, et al. Angiogenesis and anti－angiogenesis in human meoplasms. Recent deelopments and the therapeutic prospests[J]. Ann Ital Med Int, 2000; 15(1):7－19.

[6] Bruns CJ, Liu W, Davis DW, et al. Vascular endothelial growth is an in vivo survival factor for tumof endothelium in a murine model of colorectal carcinoma [J]. Cancer, 2000;89(3):488－499.

[7] Pallini R, Pierconti F, Falchetti ML, et al. Evidence for telomerase involvement in the angiogenesis of astrocytic tumors: expression of human telomerase reverse transcriptase messenger-RNA by vascular endothelial cells[J]. J Neurosurg, 2001; 94(6):961－971.

[8] Xiong S, Grijalva R, Zhang L, et al. Up－regulation of vascular endothelial growth factor in breast cancer cells by the heregulin－betal－activated p38 signaling pathway enhances e-neothelial cell migration[J]. Cancer Res, 2001;61(4):1727－1732.

[9] Okada T, Hawley RG, Kodaka M, et al. Sigmificance of VLA－4－VCAM－1 interaction and CD44 for transendothelial invasion in a bone marrow metastatic myeloma model[J]. Clin Exp Metastasis, 1999;17(7):623－629.

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