DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.22.019
第26卷第22期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 22
2004年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2004 2023

文章编号:1000-5404(2004)22-2023-03

论著

恶性胶质瘤细胞诱导内皮细胞三维成型的体外实验

白家驷[1],卞修武[1],史景泉[1],郑 江[2],辛 榕[1] (第三军医大学西南医院:[1]病理科,[2]中心实验室,重庆 400038)

提 要:目的 观察在三维胶原体外培养条件下恶性胶质瘤细胞体外诱导内皮细胞血管生成的作用。方法 采用鼠尾胶原作为内皮细胞样细胞ECV-304培养的支架,以恶性胶质瘤细胞系SHG-44作为诱导条件,观测ECV-304细胞生长和小管样结构形成的过程,测定形成曲线、小管管径和管长以及细胞周期,比较有和无SHG-44细胞诱导ECV-304细胞形成小管样结构的差异。结果 SHG-44细胞对体外三维培养的ECV-304细胞具有诱导小管形成的作用,所诱导的小管管径和管长数值均较对照组大,小管形成时间早。结论 恶性胶质瘤细胞能促进内皮细胞的生长、迁移和小管结构的形成,是研究体外血管生成研究的良好模型。

关键词:血管生成;胶质瘤;内皮细胞;细胞周期
中图法分类号:R364.3;R73-35;R730.264 文献标识码:A

Formation of tubule-like structure of endothelial cells induced by malignant glioma cells in three-dimensional culture *in vitro*

BAI Jia-si[1], BIAN Xiu-wu[1], SHI Jing-quan[1], ZHENG Jiang[2], XIN Rong[1] ([1]Institute of Pathology, [2]Central Laboratory, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of malignant glioma cells on the induction of endothelial cells to form tubule-like structure in a three dimensional culture system with collagen *in vitro*. Methods Type I collagen was employed as the culture skeleton for the culture of endothelium-like cell line EVC-304 cells with and without the culture supernatant of human malignant cell line SHG-44. The growth and cell cycles of ECV304 cells were determined and the processes of tubular formation were observed. Moreover, parameters such as the formation curves, outer and inner diameters, wall thickness and length of the tubules were measured and compared between the glioma cell induction group and the control group. Results ECV-304 cells could form tubular structures similar to angiogenesis induced by SHG-44 cell supernatant in this system. The induced tubules appeared earlier and were larger in diameter and longer in length than those in the control group. Conclusion Malignant glioma cells, which could promote the growth, migration, and tubular formation of endothelial cells, can be a good model for the studies of angiogenesis *in vitro*.

Key words: endothelial cell; angiogenesis; three-dimensional culture; glioma; cell cycle

恶性胶质瘤的血管生成活跃而独特,其微血管内皮细胞增生随肿瘤恶性程度增加而愈加明显[1],并是预后的一个较好指标[2]。肿瘤血管生成存在明显的异质性,其发生机制不清楚,但至少与肿瘤细胞在三维微环境中对内皮细胞的诱导有关[3]。为了证明我们提出的这一假设,本实验采用三维胶模型观测恶性胶质瘤细胞诱导下的内皮细胞管型形成过程和特点。

1 材料与方法

1.1 实验材料与主要试剂

人源性内皮细胞样细胞系ECV-304(ATCC CRL-2000)引自我院全军烧伤研究所,人恶性胶质瘤细胞系SHG-44由苏州医学院附属第二医院脑肿瘤研究室建系,本室传代保存。DMEM培养基和小牛血清为Hyclone公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 胶原的制备 采用体质量250 g的Wistar大鼠2只(购自第三军医大学实验动物中心),无菌条件下剥除鼠尾表皮,削离鼠尾腱、剪碎,置于4 ℃、0.1%无菌醋酸溶液中,振荡48 h。取出混悬液,4 ℃ 16 000× *g* 离心60 min,取出上清液。3倍稀释成鼠尾胶原稀释液。塑型培养于冰浴中进行。取工作

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370552,30270526)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370552, 30270526)
作者简介:白家驷(1968-),男,重庆市人,硕士研究生,主管技师,主要从事肿瘤血管生成方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68765469
通信作者:卞修武,电话:(023)68752247,E-mail:bianxiuwu@263.net
收稿日期:2004-08-30;修回日期:2004-10-09

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

液7份，加入1份新生小牛血清，1份10× DMEM培养基，1份$NaHCO_3$溶液，充分混合。

1.2.2 三维培养方法和实验分组 ECV304细胞加入预先制备鼠尾胶原培养基的24孔细胞培养板中，每孔0.5 ml，使每孔中细胞浓度为2.5×10^4/mm^2左右。培养板置37 ℃、5%CO_2混合空气、饱和湿度培养箱中培养，每天观察细胞生长情况并记录，每3天换液1次。实验分为2组：①三维培养对照组：鼠尾胶原胶培养＋DMEM对照液；②三维培养诱导组：鼠尾胶原胶培养＋诱导液。其中，诱导液由2/3体积的DMEM培养液＋1/3体积的恶性胶质瘤细胞SHG-44培养上清液。

1.2.3 小管观测方法 两组分别于培养第2天开始计数，每2天计数1次。每组6孔重复3次，计算各孔的平均管型数做为小管计数并作形成曲线。制作ECV304细胞爬片，HE常规染色，用德国Leica公司MD20型真彩色图像分析仪Spot4.08软件随机对新生管样结构进行检测分析。

1.2.4 流式细胞术检测 各组分别于培养2 d后，胰酶消化、D-Hanks清洗2次，250目钢丝网过滤，使悬液成单个细胞悬液。离心收集并用4 ℃预冷70%乙醇固定。测定前25 μg/ml碘化丙碇染色测定，采用FACstar^{plus}流式细胞仪（美国Becton Dickinson Inc.公司）进行细胞周期检测。

1.3 统计学处理

计量数据以$\bar{x}\pm s$表示。采用SPSS统计程序包，进行两样本均数间显著性t检验。

2 结果

2.1 管型计数

结果见表1。

表1 ECV304细胞三维培养管型形成情况（n=6，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Tubule formation by ECV304 cells in 3-D culture（n=6，$\bar{x}\pm s$）

Group	Culture time						
	2 d	4 d	6 d	8 d	10 d	12 d	14 d
Control	0	1.5±0.4	2.5±0.8	4.1±1.13	6.5±1.5	7.6±2.4	9.0±2.77
Induction	2.5±1.0	6.0±1.63	12.4±3.42	15.5±1.92	19.0±2.58	23.0±2.0	27.0±2.52
t	5	5.551	5.855	11.907	9.682	15.4	14.7
P	0.015	0.012	0.010	0.001	0.002	0.001	0.001

2.2 小管结构的几何参数测定结果

ECV304细胞三维培养后小管结构的管长、管径、管腔及管壁厚度检测结果见表2。

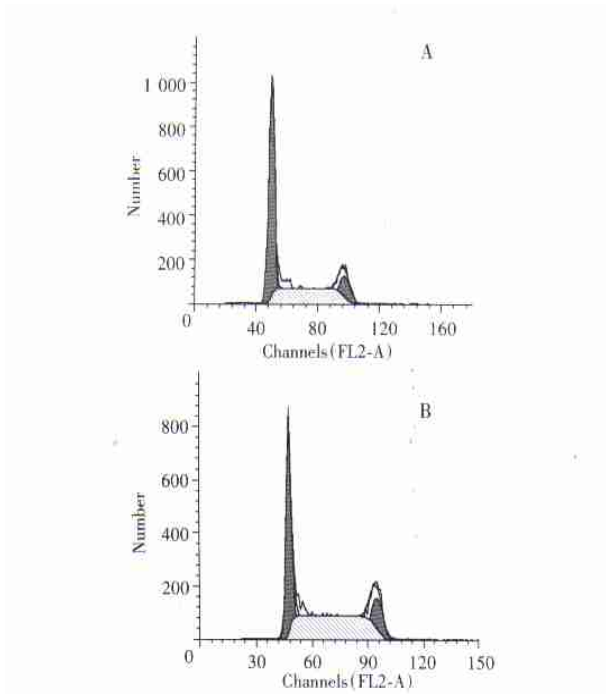
表2 ECV304细胞形成的小管结构的参数值（n=6，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Parameters of tubules formed by ECV304 cells（n=6，$\bar{x}\pm s$）

Group	Outer diameter	Inner diameter	Thickness of wall	Length
Control	452.23±43.55	226.35±34.26	117.59±22.36	368.25±35.26
Induction	602.45±47.93	412.76±51.85	123.33±26.03	768.82±146.28
t	7.009	8.805	0.623	5.638
P	0.002	0.001	0.553	0.005

2.3 细胞周期检测结果

各组细胞周期检测结果见图1。三维诱导组内皮细胞进入S和G_2/M期的细胞增多，G_0/G_1减少，细胞周期缩短。



A: Control cell; B: Induced cell

图1 各组细胞周期检测结果

Fig 1 Cell cycles in the two groups

2.4 三维培养小管结构比较

ECV304内皮细胞诱导组与正常组所形成的小管结构比较，诱导组所形成的管样结构较粗大而且长（图2），正常组形成的小管结构较小而且短（图3）。



图2 诱导组形成的管样结构较粗大、长

Fig 2 The tubule-like structure was larger and longer in the induction group

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

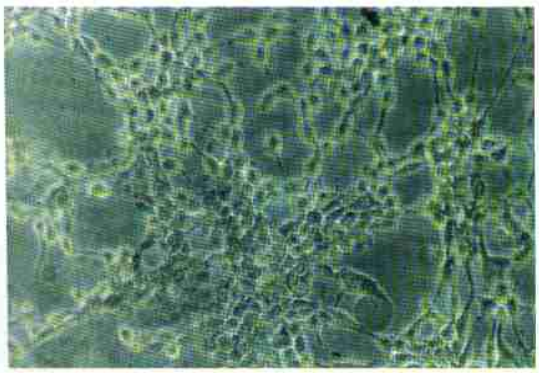


图 3　正常组形成的管样结构较细小、短

Fig 3　The tubule-like structure was smaller and shorter in the control group

3　讨论

肿瘤血管生成有利于肿瘤生长、浸润和转移。肿瘤不仅通过肿瘤血管从宿主获得营养物质、排泄代谢产物及气体交换, 而且通过肿瘤血管向宿主输入大量肿瘤细胞, 导致肿瘤侵袭和转移[4,5]。研究显示, 体内实体肿瘤的直径＜2 ~3 mm 时, 主要依靠扩散在细胞周围的营养物质和氧气生存。随着瘤体的增大, 肿瘤及宿主组织将建立起新生血管网以供给瘤细胞营养。已有研究证明, 血管生成过程取决于肿瘤周围的微环境中正负调控因子的平衡, 这些因子主要来源于瘤细胞, 即瘤细胞具有诱导和调控肿瘤血管生成的作用。本课题组结合以往的研究成果, 选择了胶质瘤上清液作为诱导剂, 体外建立胶质瘤血管体外成形模型, 取得了良好的效果。

研究肿瘤血管生成这一复杂过程需要良好的体内和体外试验模型。20 世纪 80 年代以前, 人们对内皮细胞血管生成的体外研究只用传统的平面(二维)细胞培养技术, 不能提供细胞生长的三维空间, 因而限制了离体血管生成研究。内皮细胞的三维培养法是利用单一离体血管内皮细胞在一定条件下形成管状结构的特点, 是揭示在体血管生成最简单易行的模型。在体外条件下至少有两类物质影响内皮细胞形成管样结构, 即可溶性和不可溶性因素, 前者指内皮细胞促有丝分裂原; 后者指细胞外基质(extracellular matrix, ECM), 如粘连蛋白、纤连蛋白及各种胶原分子。细胞底物中 ECM 的浓度也是影响体外管样结构形成的重要因素之一, 因此针对不同的 ECM 可以进行血管生成治疗[6~8]。内皮细胞包埋在有延展性的胶原中可以分化, 形成小管样结构; 而在硬度较大的胶原中只增殖, 形成单层细胞。由此可见, 内皮细胞和 ECM 间的相互机械作用可能参与调节血管生成, ECM 通过其拮抗细胞产生的机械力, 从而局部调节可溶性因子促血管生成作用。本实验所采用的鼠尾胶原主要成分为Ⅰ型胶原, 它是构成支持细胞形态和组织连接骨架整体重要组成部分, 广泛存在于各种组织, 以真皮、肌腱和骨骼为甚。本实验鼠尾胶原浓度低于 1%, 凝固后形成有延展性的胶质, 在平面上接种细胞, 更有利于细胞的移行和向胶质内浸润, 形成管腔样结构。

我们的实验显示, 在未加入胶质瘤细胞培养时, 内皮细胞主要呈卵石样排列生长或形成分散的小管结构; 加入胶质瘤上清后, 卵石样排列生长相互连接形成网状结构。网状结构生长旺盛, 逐渐形成小管型, 然后它们融合并联成小管网状。实验还显示, 这种形成管型的内皮细胞核/浆比例发生了变化, 并且这种变化具有统计学意义, 说明这种形成管型的内皮细胞染色体复制更快。流式细胞术检测也显示, 进入 G_2/M 期的细胞增多, 而 G_0/G_1 期的细胞减少, 说明在胶质瘤上清诱导下形成管型的内皮细胞染色体复制周期缩短了, 细胞增殖加快。

在我们建立的体外三维血管生成模型中形成的管型结构, 管型粗大、管腔较大, 细胞排列较整齐, 未形成或较少形成完整的血管壁, 可能与缺乏平滑肌细胞协调作用有关。但该实验模型较真实地模拟了体内血管生成的过程, 展示了与血管生成有关的各因素的相互作用, 为深入了解肿瘤血管生成的分子机制及从抗血管生成途径治疗胶质瘤的研究提供了实验方法。

参考文献:

[1] Bian X W, Du L L, Shi J Q, *et al*. Correlation of bFGF, FGFR-1 and VEGF expression with vascularity and malignancy of human astrocytomas [J]. Anal Quant Cytol Histol, 2000, 22(3): 267－274.

[2] 卞修武, 杜琳琳, 陈自强, 等. 星形细胞肿瘤血管生成活性和血管内皮生长因子与诱生型一氧化氮合酶表达的定量研究[J]. 中华病理学杂志, 2001, 30(1): 23－26.

[3] Bian X W, Chen J H, Jiang X F, *et al*. Angiogenesis as an immunopharmacologic target in inflammation and cancer[J]. Int Immunopharmacol, 2004, 4(12): 1537－1547.

[4] 卞修武. 血管生成、治疗性血管生成和抗血管生成[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(3): 249－250.

[5] Brat D J, VanMeir E G. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma[J]. Lab Invest, 2004, 84(4): 397－405.

[6] Heino J. The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions[J]. Matrix Biol, 2000, 19(4): 319－323.

[7] Jayasankar V, woo Y J, Bish L T, *et al*. Inhibition of matrix metalloproteinase activity by timp-1 gene transfer effectively treats ischemic cardiomyopathy[J]. Circulation, 2004, 110(Suppl1): Ⅱ180－Ⅱ186.

[8] 郑念东, 熊献尧, 王　山, 等. 残留腔间质内化疗治疗脑胶质瘤的临床研究[J]. 局解手术学杂志, 2003, 12(3): 212－213.

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net