DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.03.018

循环内皮细胞来源的实验研究*
——由 VEC 过渡到 CEC 的直接证据

杨映波 王正国 (第三军医大学大坪医院创伤科) 630042

提 要 循环内皮细胞(CEC)检测能在活体内研究血管内皮细胞(VEC)的变化,具有较高的临床应用价值,但其来源尚待研究,尤其缺乏从 VEC 过渡到 CEC 的直接证据。本文采用人脐静脉内皮细胞培养等手段,对 CEC 的来源进行了比较细致的研究。结果表明:(1)存在于正常人外周血中的 CEC 来源于正常代谢过程中脱落的 VEC;(2)本文获得了从 VEC 过渡到 CEC 的直接证据;(3)CEC 的形成是一渐变过程。

关键词 内皮;细胞,培养的;脐静脉

循环内皮细胞(CEC)是指在生理或病理情况下,凡是从循环血中获得的血管内皮细胞(VEC)。其中包括无核的 VEC 残骸和有核的,可供体外培养的 VEC[1]。由于 CEC 是目前在活体内仅有的可作为血管损伤的特异而直接的指示物[2],因而受到国外学者的广泛关注[3]。最近,我们进行了 CEC 研究的初步尝试[4],并从实践中认识到 CEC 研究可能具有较高的临床应用价值[5]。但是,迄今为止国内外文献中尚未见到有关 CEC 来源的比较细致的研究的报道,尤其缺乏 VEC 过渡到 CEC 的直接证据。基于上述认识,我们采用内皮细胞培养等技术,对 CEC 的来源进行了研究。

1 材料与方法

1.1 人脐静脉内皮细胞(HUVEC)培养

1.1.1 收集健康胎儿脐带 30~50cm,排尽残血,剪去钳夹部分。反复灌洗脐静脉后,注入 0.25%胰蛋白酶液 5ml。夹闭脐带两端,置 37.0℃孵育 10min 后,收集消化液。继而以完全培养液 5ml 灌洗脐静脉,并收集到同一离心管中。然后,室温下离心 10min(1000rpm),制备细胞悬液。

1.1.2 取少量细胞悬液,用 0.4%台盼蓝染色后,计数活细胞。将细胞浓度调至 $4\sim5\times10^5$/ml 后,将其均匀分装于 35mm 细胞培养皿内(其中盛有约 0.3cm×0.5cm 盖玻片一块)。

1.1.3 将 HUVEC 置于 37.0℃、5%CO2 培养箱(1875TC,美国)内培养,每天定时观察。第一个 24h 后更换原培养液的 1/2,此后每隔 48h 换液一次。一般 3~6 天后融合,即可开始实验。

2 形态学观察

2.1 CEC 的观察

取正常人外周血分离出 CEC,光镜(OLYMPUS)下观察其形态特征〔分离 CEC 的方法请见另文[4]〕。

2.2 培养 HUVEC 观察

倒置显微镜(XSJ-D,重庆)下观察细胞形态变化。取呈融合状态的 EC 培养片投入冷丙酮内 4℃固定 10min。部分培养片用 Giemsa 染色后在光镜下观察。另取部分培养片供扫描电镜(JSM-T300,日本)观察。

3 结果

3.1 CEC 的形态特征

经分离处理后,镜下罕见其它细胞成分。加之 CEC 体积较大,形态特殊,故易于辩认。CEC 形态多样,大多为极不规则的多边形。绝大多数细胞无核,呈皱缩、折叠或扭曲状(图 1)。

3.2 HUVEC 的形态观察

扫描电镜下,可见细胞培养片中存在聚集成团的

* 国家自然科学基金资助项目

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

巨大细胞。其形状不规则，酷似 CEC。细胞中部稍隆起，边缘较薄，有卷曲，局部有缺损。细胞表面满布大小不等的圆形或扁盘形质膜泡，形似葡萄簇状(图 2)。

从同一份 HUVEC 的培养片中，可见到不同的细胞形态，大致分为四种：(1)多数细胞显示了正常的细胞形态—细胞呈长梭形或多角形，大小均匀，相互融合成片，呈镶嵌状排列。胞核清晰，胞浆丰满，呈卵圆形(图 3)；(2)细胞排列紊乱，大小不均。有的细胞明显肿胀，胞核偏移，胞质中可见多个空泡形成(图 4)；(3)有的细胞体积增大，近乎椭圆。核固缩，胞质中有多个散在分布的颗粒。胞膜不连续。与邻近正常生长的 EC 形成鲜明对照(图 5)；(4)有的细胞呈现出硕大而极不规则的多边形。未见胞核，胞膜皱缩，胞浆中有颗粒状物质(图 6)。此种细胞的外观已十分接近从循环血中分离获得的 CEC(图 1)。

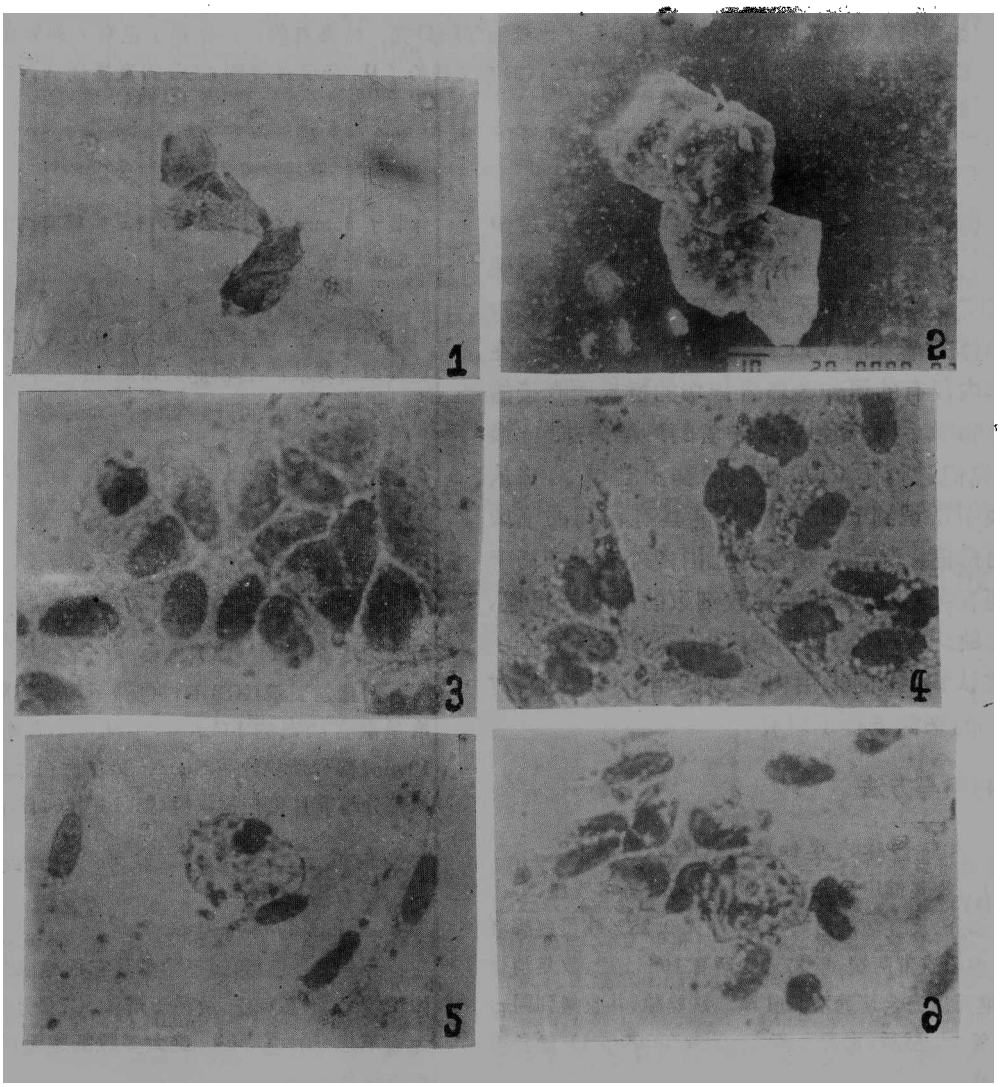


图 1 循环内皮细胞 ×250

图 2 培养内皮细胞中的脱落细胞（扫描电镜）×1000

图 3 培养的人脐静脉内皮细胞(1) ×250

图 4 培养的人脐静脉内皮细胞(2) ×250

图 5 培养的人脐静脉内皮细胞(3) ×250

图 6 培养的人脐静脉内皮细胞(4) ×250

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

4 讨论

理论上认为，VEC 的平均寿命大约为 3 个月。据估计，70kg 体重的人约有 10^{12} 个 VEC[6]。因此，每天都有许多 VEC 衰老、脱落，经血液携带至特定的场所进行处理。这些从循环血中获得的 VEC 即为 CEC[1]。

1970 年，Gaynor 等[7]在兔血中发现了一种不同于常规血细胞的细胞，他们把这些细胞与血管壁的 VEC 比较之后，认为很可能是 VEC。此后，Hladovec 等[8]用促 VEC 脱落剂擦拭大鼠腔静脉内壁，证实损伤后的 VEC 形态与 CEC 形态相同。近来，Iwata 等[9]用免疫荧光检测技术证实 CEC 呈现 ⅧR:Ag 荧光着色。但是，迄今为止国内外文献中尚未见到应用细胞培养技术，对 CEC 的来源进行比较细致研究的报道，尤其缺乏从 VEC 过渡到 CEC 的直接证据。

本文从培养 HUVEC 的光镜和扫描电镜观察中，均发现了酷似 CEC 形态的细胞。Weber 等[10]观察到开始衰老的 VEC 总比年轻 VEC 大，并常可见到巨大细胞。而且，这些衰老的 VEC 皱缩、僵硬，不能复盖培养瓶表面。因而，CEC 的形态表明它们来自正常新陈代谢中衰老、脱落的 VEC。从同一份 VEC 培养片中所见到的四种不同的细胞形态，反映了培养 VEC 处于不同代谢阶段的变化。为说明 VEC 过渡到 CEC 提供了较为直接的证据。同时揭示出，由于细胞所处的代谢阶段不同，其形态变化也不相同。如细胞变圆、胞质肿胀、空泡形成、胞膜中断乃至胞核脱落，细胞呈现出不规则的多边形等。最终，这些细胞脱落并形成 CEC 所具有的特殊形态，循环于外周血中，成为 CEC。因而从 VEC 到 CEC 是一个逐渐发展的过程。

参考文献

1. 杨映波 王正国。循环内皮细胞研究的意义和动向。国外医学：心血管疾病分册 1992；3：158
2. Takahashi H, Harker LA. Measurement of human endothelial cells in whole blood. Thromb Res 1983; 31:1
3. Sinzinger H, Virgolini I, Fitscha P. Pathomechanisms of atherosclerosis beneficially affected by prostaglandin E_1 (PGE_1)—an update. Vasa Suppl 1989; 28:6
4. 杨映波 王正国 刘怀琼，等。血循环中内皮细胞数量变化意义的初探。第三军医大学学报 1990；12：209
5. 祝之明 杨成明 宋克群，等。高血压患者血液中血管内皮细胞的变化及其临床意义。中华心血管病杂志 1991；19：217
6. Jaffe EA. Cell biology of endothelial cells. Hum Pathol 1987; 18:234
7. Gaynor E, Bouvier C, Spaet TH. Vascular lesions: possible pathogenetic basis of the generalized shwartzman reaction. Science 1970; 170:986
8. Hladovec J, Rossmann P. Circulating endothelial cells isolated together with platelet and the experimental modification of their counts in rats. Thromb Res 1973; 3:665
9. Iwata Y, Kuzuya F, Hayakawa M, et al. Circulating endothelial cells fail to induce cerebral infarction in rabbits. Stroke 1986; 17:506
10. Weber E, Vatti R, Berti G. Morphological aspects in phasecontrast and transmission electron microscopy of senescent culture of bovine aortic endothelial cells. Boll Soc Ital Sper 1984; 60:1643

（收稿：1992-03-09；修回：1992-04-27）

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

An Experimental study on the origin of circulating endothelial cells from the conversion of vascular endothelial cells

Yang Yingbo, Wang Zhengguo. (Department of Traumatology, Daping Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630042)

Abstract Obsevation on the circulating endothelial cells (CEC) can be used to study the changes of the vascular endothelial cells (VEC) in vivo, which is quite valuable in its clinical application. Neverthiless, the origin of CEC remains not clarified. In this study, the origin of CEC was investigated with cultures of the endothelial cells of human umbilical vein. It was found that CEC is a kind of cells existing in circulating blood and originating from desquamated VEC under physiological conditions. The direct proof of this conversion was provided. And the conversion of VEC to CEC is a process of steady progression.

Key words endothelium; cells, cultured; umbilical veins

幼龄小鼠脾切除和脾保留对肺炎球菌感染的影响

陈维佩 刘经权* 刘年珊** 张天飞 （第三军医大学训练部应用解剖及手术学教研室）630038

随着免疫学的进展，脾脏功能日趋重视，但从年龄观点，保脾和切脾的问题仍有争议[1]。为此，本实验就不同年龄小鼠脾脏的去留对肺炎球菌感染的影响作进一步研究，现报道如下：

1 材料与方法

健康雄性小鼠 224 只，幼龄鼠 3～4 周龄，体重 12～15g；成年鼠 3～4 月龄，体重 30～35g，随机分组（表 1、2）。Ⅰ型肺炎球菌干燥菌种经复苏、培养、转种后配制成 80 万/ml 悬液。以正常组动物 LD_{50} 为标准，即幼龄小鼠为 6 万细菌数，成年小鼠为 10 万，分别对各年龄组动物行腹腔注射，观察 3d 内死亡率及病理变化。

2 结果

各组动物感染肺炎球菌后死亡率见表 1、2。

表 1 幼龄各组小鼠感染肺炎球菌死亡率

	死亡率		
	脾切除组	假手术组	正常组
实验 I	82%(18/22)		32%(7/22)
实验 II	85%(17/20)	55%(11/20)	50%(10/20)

注：和对照值比 $P < 0.01$

表 2 成年各组小鼠感染肺炎球菌死亡率

	死亡率		
	脾切除组	假手术组	正常组
实验 I	80%(16/20)	65%(13/20)	65%(13/20)
实验 II	85%(17/20)	75%(15/20)	65%(13/20)

注：和对照值比 $P > 0.05$

（下转 258 页）

* 西南医院内科
** 重庆医科大学微生物学教研室

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