

肿瘤基质血管内皮细胞模型的建立及生物学特性研究

朱红梅¹, 汤为学², 张大志¹

Establishment and Identification of Tumor Vascular Endothelial Cell Model

ZHU Hong-mei¹, TANG Wei-xue², ZHANG Da-zhi¹

1. Institute for Viral Hepatitis and the Second Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China; 2. Department of Pathophysiology

Abstract :Objective To establish the cell model of vascular endothelial cell in tumors and explore its biological features. **Methods** The normal human umbilical vein endothelial cell ECV304 was cultured with the supernatant of human ovarian cancer cell SKOV3 for three and half months, and ECV304-SKOV3 cells with stable growth was acquired. Then the changes of their biological characteristics were determined by light microscopy, electron microscopy, karyotype analysis, MTT assay, and flow cytometry. The expression of proliferating cell nuclear antigen(PCNA), bcl-2, tenascin (TN), matrix metalloproteinase 9(MMP-9), and telomerase activity was detected by immunocytochemistry and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) respectively. The ability to synthesize proteins was determined. **Results** Abnormal nuclei and compartments with microvilli were observed in ECV304-SKOV3 cells and their chromatosome modes increased slightly. As compared with parental cells, the population doubling time of ECV304-SKOV3 cells shortened, mitotic indices increased, the expression of PCNA, bcl-2 and MMP-9 enhanced ($t \geq 2.4671, P < 0.01$), while TN decreased ($t = 2.2473, P < 0.05$), the cell number in S-phase increased, while in G₀/G₁-phase decreased significantly ($\chi^2 = 923.313, P < 0.01$). ECV304-SKOV3 cells were more sensitive than ECV304 to anticancer drugs with inhibition effect on S-phase or S and M-phase, in accordance with SKOV3 cells ($F \geq 24.14, P < 0.01$). The ability to synthesize proteins and telomerase activity enhanced ($t = -12.2465, P < 0.001; t = -25.2990, P < 0.001$). **Conclusion** The results suggest that ECV304-SKOV3 cells have some biological characteristics of vascular endothelial cells in tumors, including proliferating more quickly, surviving longer and more functional, expressing some angiogenic factors stronger, and can act as a cell model for developing drugs targeting the tumor vascular endothelial cells in the future.

Key words: Tumor; Endothelial cells; Vasculature; Cell model

摘 要:目的 建立肿瘤基质血管内皮细胞模型并探讨其生物学特性。方法 用人卵巢癌细胞 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。观察其形态改变, 检测其生长情况, 免疫细胞化学测定其增殖细胞核抗原(PCNA)、bcl-2、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、粘蛋白(TN)表达变化, 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)测定其端粒酶活性, 并分析其核型、蛋白合成能力、对常用抗癌药物的反应性。结果 ECV304-SKOV3 细胞出现畸形核、有微绒毛的腔隙, 染色体总数略有增加。细胞群体倍增时间较亲代细胞 ECV304 缩短; 分裂指数增高; 表达 PCNA、bcl-2、MMP-9 增强 ($t \geq 2.4671, P < 0.05$), 而 TN 减弱 ($t = 2.2473, P < 0.05$); S 期细胞数增加, G₀/G₁ 期细胞数减少 ($\chi^2 = 923.313, P < 0.01$), 增殖指数(PI)明显增高 ($\chi^2 = 570.197, P < 0.01$)。对作用于 S 期或 S 期和 M 期的抗癌药物较 ECV304 敏感, 且与 SKOV3 癌细胞一致 ($F \geq 24.14, P < 0.01$)。蛋白质合成能力增强 ($t = -12.2465, P < 0.001$)。端粒酶活性强于亲代细胞 ECV304 ($t = -25.2990, P < 0.001$)。结论 ECV304-SKOV3 细胞较亲代细胞 ECV304 增殖快, 核型发生变化, 存活能力强, 功能活跃, 某些血管形成因子表达增强, 具有肿瘤基质血管内皮细胞的某些特性, 可作为肿瘤基质血管内皮细胞模型用于进一步研究。

关键词: 肿瘤; 内皮细胞; 血管; 细胞模型

中图分类号: R73-35 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2005)06-0329-04

收稿日期: 2004-06-15; 修回日期: 2005-01-25

作者单位: 1. 400010 重庆医科大学肝炎研究所, 重庆医科大学附属第二医院, 2. 病理生理学教研室

0 引言

恶性肿瘤是严重威胁人类健康的主要疾病之一。实体瘤直径超过 1~2mm,其生长必须依赖于肿瘤新生血管。于是 Kennel 等^[1]于 1991 年提出靶向肿瘤基质血管内皮细胞的抗体导向治疗策略,由于肿瘤基质血管内皮细胞很难获得,对其异常表型的研究只能用一些替代措施^[2-4]。我们用人卵巢癌细胞 SKOV3 培养上清液诱导正常人内皮细胞 ECV304,传 30 代后,获得能稳定生长的 ECV304-SKOV3 细胞,检测其生物学特性,并与亲代细胞比较;也为进一步探寻其转化机制、进行靶向治疗研究提供细胞模型。

1 资料与方法

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 由本校张诤博士惠赠。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

SKOV3 细胞与 ECV304 细胞分别接种于含 10% 小牛血清 (bovine serum, BS) 的 DMEM 培养液和含 10% BS 的 DMEM-F12 培养液中,置 37℃、5%CO₂ 饱和湿度孵箱内培养。

1.2.2 肿瘤基质血管内皮细胞模型的建立

调整 SKOV3 细胞浓度为 2.5×10^5 / mL,取 10mL 接种至 150mL 培养瓶中。3 天收集上清液,2000r/min 离心 40min 以去细胞碎片,0.22μm 微孔滤膜过滤除菌,-20℃ 保存备用。经预实验选定 ECV304 细胞浓度为 5×10^4 / mL 作传代培养,用制备的上清液与 20% BS DMEM-F12 完全培养基 1:1 (v/v) 制成的培养液培养,每 3 天传一代,历时 3 个半月,至 30 代,用 ECV304-SKOV3 表示。之后仍用该培养液培养。亲代 ECV304 细胞同步培养。

1.2.3 细胞形态学观察

通过光镜、电镜进行形态学观察。

1.2.4 细胞增殖动力学测定

1.2.4.1 生长曲线及群体倍增时间的测定 参照文献[5],并计算群体倍增时间(T_D):

$$T_D = T \times \lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)$$

N_0 : 初始细胞数; N_t : 终末细胞数; T : $N_t - N_0$ 时间(h)

1.2.4.2 四甲基偶氮唑盐(MTT)法测定细胞的生长曲线

1.2.4.3 流式细胞仪(flow cytometry, FCM)分析细胞周期分布,求出细胞的增殖指数(proliferating index, PI):

$$PI = \frac{S + G_2/M}{G_0/G_1 + S + G_2/M}$$

1.2.5 细胞染色体的制备和分析

参照文献[5]。油镜下观察,计数 100 个分裂细胞的染色体数;100 倍光镜下随机取 10 个视野,每个视野随机计数 50 个细胞,分裂细胞所占百分比为该细胞的分裂指数。

1.2.6 MTT 法检测多种抗癌药物的细胞毒作用

调整 SKOV3、ECV304-SKOV3、ECV304 细胞浓度为 5×10^4 / mL;每孔接种 200μL 入 96 孔培养板内,加入体外药敏实验单用药 5-氟尿嘧啶(5-Fu)、阿霉素(EPI)、丝裂霉素(MMC)、长春新碱(VCR)、足叶乙甙(Vp16)各 20μL,每种药重复 4 孔,另设试剂对照组与细胞对照组。重复 3 次。MTT 法测定,计算每种药的抑制率:

$$\text{抑制率} = 1 - \frac{\text{实验组平均 A 值}}{\text{对照组平均 A 值}} \times 100\%$$

1.2.7 细胞总蛋白测定

以 PBS 配制 0mg/mL、0.025mg/mL、0.05mg/mL、0.1mg/mL、0.2mg/mL、0.4mg/mL、0.8mg/mL、1mg/mL 共 8 个浓度的牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)工作液。分别取 1×10^6 个 ECV304-SKOV3 与 ECV304 细胞,1 000r/min 离心 5min,去上清液,加入 0.3mol/L NaOH 0.5mL,于 100℃ 裂解 30min。每种细胞重复 3 管,按考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白浓度,求出线性方程与样品蛋白浓度。

1.2.8 免疫细胞化学法(SP)检测增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、bcl-2、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)、粘多糖(tenascin, TN)的表达:PCNA、MMP-9、TN 单克隆抗体购自福州迈新生物技术有限公司,bcl-2 多克隆抗体购自北京中山生物有限公司,按试剂盒说明书操作,以 PBS 代替一抗作阴性对照。胞浆黄(棕)色着色为阳性(PCNA 阳性部位在胞核),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 = $\sum P_i(i+1)$ ($i=0,1,2,3$; P_i 表示评分为 i 的比例)计算 HSCORE 得分^[6]。

1.2.9 端粒酶活性测定

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

1.2.10 统计检验

计量资料采用 t 检验、方差分析、线性相关分析,计数资料采用 χ^2 检验。数据用 SAS 统计软件包

分析。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

光镜下 ECV304 细胞单层生长,呈典型的卵石样镶嵌排列,可见双核细胞;ECV304-SKOV3 可重叠生长,较多双核及多核细胞,可见畸形核细胞,见图 1。电镜下 ECV304 细胞结构未见异常;ECV304-SKOV3 细胞有的变长呈纺锤形,可见畸形核,核仁边集,核浆比例增加,线粒体、滑面内质网增多,能见高尔基复合体、粗面内质网,较多细胞浆内有微绒毛的腔隙,见图 2。

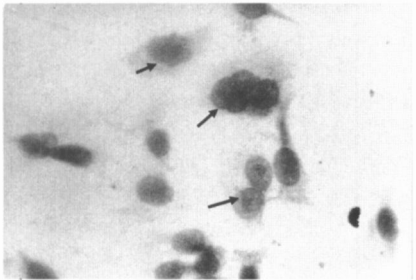


图 1 ECV304-SKOV3 细胞光镜观察
瑞氏染色 ×400

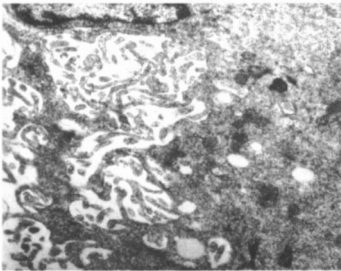


图 2 ECV304-SKOV3 细胞电镜观察
醋酸铀 + 枸橼酸铅 ×12 000

2.2 细胞增殖动力学测定

2.2.1 计数法测定细胞的生长曲线及群体倍增时间 从 1~7 天细胞的生长曲线中可看出 ECV304-SKOV3 细胞生长较亲代细胞 ECV304 快,见图 3。ECV304、ECV304-SKOV3 细胞的群体倍增时间分别为 47.212 小时、39.694 小时,ECV304-SKOV3 较亲代细胞缩短 8 小时,两者比较差异无显著性。MTT 法测得细胞生长曲线的结果相似。

2.2.2 细胞周期分析 ECV304-SKOV3 细胞 G₀/

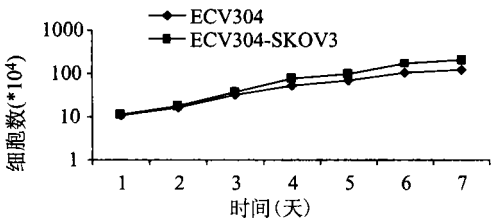


图 3 计数法测得 ECV304、ECV304-SKOV3 细胞的生长曲线

G₁ 期细胞数减少,S 期细胞数增加,G₂/M 期细胞数相对减少,其周期分布与亲代细胞 ECV304 相比差异非常显著($\chi^2 = 923.313, P < 0.01$)。增殖指数由 25.08 %增高到 37.59 %($\chi^2 = 570.197, P < 0.01$)。

2.3 细胞染色体分析

ECV304、ECV304-SKOV3 细胞的染色体众数分别为 46、48,分别集中于 45~50、48~56。分裂指数分别为 6.8 %、8.6 %。

2.4 抗癌药的细胞毒作用

主要作用于 S 期或 S 期和 M 期的 5-Fu、MMC 对 ECV304-SKOV3 抑制作用与对 SKOV3 癌细胞一致,明显强于对 ECV304 细胞的抑制作用($F \geq 24.14, P < 0.01$)。

2.5 细胞总蛋白测定

BSA 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 $y = 0.6897x + 0.0229$,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 $(0.665 \pm 0.019) \text{ mg/mL}$ 和 $(0.503 \pm 0.026) \text{ mg/mL}$ ($t = -12.2465, P < 0.001$)。

2.6 细胞 PCNA、bcl-2、MMP-9、TN 的表达

ECV304、ECV304-SKOV3 细胞表达 PCNA 强阳性,阳性表达率分别为 93.8 %、99.4 %。ECV304、ECV304-SKOV3 细胞中等强度表达 MMP-9,后者稍强,阳性率分别为 95 %、96 %。表达 TN 很弱,均以弱阳性为主,阳性率分别为 70.4 %、64 %。表达 bcl-2 强阳性,均 100 % 表达。其 HSCORE 得分见表 1。

2.7 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

表 1 ECV304、ECV304-SKOV3 细胞表达 MMP-9、PCNA、TN、bcl-2 的 HSCORE 得分($\bar{x} \pm s$)

细胞组别	视野数	MMP - 9	PCNA	TN	bcl-2
ECV304	10	2.348 ±0.112	2.492 ±0.115	1.872 ±0.186	2.712 ±0.080
ECV304-SKOV3	10	2.458 ±0.086	3.062 ±0.058	1.696 ±0.163	2.802 ±0.069
t		t = 2.467	113.9565	2.2473	2.7038
P		< 0.05	< 0.01	< 0.05	< 0.05

照 $A = 0.02$, 阳性对照 $A = 1.07$)。

3 讨论

实体瘤生长与发展必须依赖于肿瘤新生血管。血管生成,为肿瘤发展运输养分排除代谢产物;且新生的血管内皮细胞分泌某些生长因子促进肿瘤细胞生长与移动^[7]。因此提出了靶向基质血管内皮细胞的抗血管生成治疗策略^[1]。现有研究手段主要是用对数生长期内皮细胞、生长因子短暂刺激内皮细胞、转染生长因子基因入内皮细胞来观察肿瘤基质内皮细胞的表型变化情况^[2-4],这些作用方式影响因素单一,与体内实际情况相差较大。

国内袁玫等^[8,9]的研究表明肿瘤细胞培养上清液能使正常内皮细胞发生类似肿瘤微环境下血管内皮细胞的变化。本实验中受 SKOV3 细胞培养上清液持续作用的 ECV304-SKOV3 细胞在多方面有异于其亲代细胞的特征。首先形态上出现畸形核、腔隙等表型改变,有报道肿瘤基质血管内皮细胞可能出现某些异常表型^[10]。生长增快,这可能与 PCNA 表达增强和线粒体、滑面内质网增多有关,也与受到来自 SKOV3 细胞分泌的 VEGF 刺激生长作用有关。其次,其染色体众数由 46 增加到 48,为亚三倍体,这是细胞恶性转化的表型特征,且端粒酶活性明显增高,bcl-2 表达增强,表明 ECV304-SKOV3 细胞的存活能力增强。Pallini 等^[11]报道在脑部星形细胞瘤发展过程中,增生的内皮细胞可能经历转化,其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高。端粒酶活性与细胞周期有关:永生细胞在 G_1/G_0 期开始表达端粒酶活性,至 S 期达高峰, G_2/M 期降低^[12],这与我们测定的细胞周期分布结果一致。第三,转化为血管生成表型,表达粘附素 TN 减弱,这利于其游走、芽生;同时表达 MMP-9 增强,它能促进内皮细胞游走、重塑基质形成管型^[13]。最后,对抗癌药较敏感,这与其增殖快有关,有报道几种常用化疗药引起内皮细胞凋亡而起到抗血管生成作用^[14]。

我们建立的异于正常血管内皮细胞的肿瘤基质血管内皮细胞模型 ECV304-SKOV3,能稳定生长,有肿瘤基质血管内皮细胞的某些转化特征,对某些

抗癌药较敏感,可作为进一步研究其转化机制和开发靶向肿瘤基质血管内皮细胞药物的细胞模型。

参考文献:

- [1] Kennel SJ, Falcioni R, Wesley JW. Microdistribution of specific rat monoclonal antibodies to mouse tissues and human tumor xenografts[J]. *Cancer Res*,1991,51(5):1529-1536.
- [2] Schwart MA, Kandel J, Brett J, et al. Endothelial-Monocyte activating polypeptide II, a novel antitumor cytokine that suppresses primary and metastatic tumor growth and induces apoptosis in growing endothelial cells[J]. *J Exp Med*, 1999,190(3):341-353.
- [3] Colorado PC, Torre A, Kamphaus G, et al. Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen[J]. *Cancer Res*,2000,60(9):2520-2526.
- [4] Nor JE, Christensen J, Liu J, et al. Up-Regulation of Bcl-2 in microvascular endothelial cells enhances intratumoral angiogenesis and accelerates tumor growth[J]. *Cancer Res*,2001,61(5):2183-2188.
- [5] 杨俊霞,汤为学. 人肝癌顺铂耐药细胞系的建立及其生物学特征[J]. *癌症*,2002,21(8):872-876.
- [6] Harrington DJ, Lessey BA, Rai V, et al. Tenascin is differentially expressed in endometrium and endometriosis [J]. *J Pathol*, 1999,187(2):242-248.
- [7] 陈盛钰. 血管生成抑制剂与肿瘤治疗[J]. *临床医学(台湾)*, 2001,47(1):27-30.
- [8] 袁玫,李沛雨,李力,等. 一个肿瘤区新生血管内皮细胞的标志物[J]. *细胞与分子免疫学杂志*,1998,14(3):171-174.
- [9] 夏洪天,黄志强,袁玫,等. 靶向血管内皮细胞治疗肝癌的实验研究[J]. *中华肝胆外科杂志*,2000,6(4):294-296.
- [10] Parrott JA, Nilsson E, Mosher R, et al. Stromal-epithelial interactions in the progression of ovarian cancer: influence and source of tumor stromal cells[J]. *Mol-Cell-Endocrinol*,2001,175(1-2):29-39.
- [11] 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.
- [12] Holt SE, Wright WE, Shay JW. Regulation of telomerase activity in immortal cell lines[J]. *Mol Cell Biol*, 1996,16(6):2932-2939.
- [13] Okada T, Hawley RG, Kodaka M, et al. Significance 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.
- [14] Schirner M. Antiangiogenic chemotherapeutic agents[J]. *Cancer Metastasis Rev*,2000,19(1-2):67-73.

[编辑校对:安 凤]