

内皮祖细胞在裸鼠体内再现人血管瘤的生物学特性研究

吴军军, 张莉, 蒋邦红, 霍继武, 宋培军

[摘要] **目的:** 研究人血管瘤内皮祖细胞(EPcs)在裸鼠体内分化情况, 进一步揭示其生物学特性。 **方法:** 组织块法体外培养增生期血管瘤内皮祖细胞(经 CD31、CD34 及 VIII 因子相关抗原鉴定), 浓集后分别种植于裸鼠双侧胸壁、腰部皮下, 动态观察移植瘤生长情况及组织学变化, 并用血管内皮细胞特异性标志物鼠抗人 CD31、CD34 免疫组化单克隆抗体染色研究成瘤体的同源性。 **结果:** 体外培养血管瘤内皮祖细胞生长良好, 细胞计数为 3×10^8 个/培养瓶, CD31、CD34 及 VIII 因子相关抗原免疫组化检测阳性表达, 裸鼠皮下植入后所形成的瘤体与原血管瘤生物学特点及病理特征相似, 经 CD31、CD34 鉴定瘤体来源于人血管瘤内皮细胞。 **结论:** 内皮祖细胞是血管瘤发生的细胞来源, 此可作为血管瘤的动物模型, 为血管瘤的研究提供较理想平台。

[关键词] 血管瘤; 内皮祖细胞; 动物模型; 裸鼠

[中图分类号] R 732.2

[文献标志码] A

DOI: 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2019.05.002

Biological characteristics of the endothelial progenitor cells in regenerating human hemangioma in nude mice

WU Jun-jun, ZHANG Li, JIANG Bang-hong, HUO Ji-wu, SONG Pei-jun

(Department of Plastic Surgery, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the differentiation of human hemangioma endothelial progenitor cells (EPcs) in nude mice, and further reveal its biological characteristics. **Methods:** The hemangioma endothelial progenitor cells in proliferative stage were cultured *in vitro*, identified by CD31, CD34 and VIII-factor related antigens, and subcutaneously inoculated into the bilateral chest wall and waist of nude mice. The growth characteristics and histologic changes of transplanted tumors were regularly observed. The transplanted tumor's homology was identified by immunohistochemical staining of the vascular endothelial cell specific marker CD31 and CD34. **Results:** The growth of EPcs was good *in vitro*, the number of EPcs was 3×10^8 , and the positive expressions of CD31, CD34 and VIII-factor related antigen were detected by immunohistochemistry. The biological and pathological characteristics between tumor formation after subcutaneous implantation and original hemangioma were similar in nude mice. The tumor identified by CD31 and CD34 was derived from human hemangioma endothelial cells. **Conclusions:** The cell source of hemangioma is derived from EPcs, which can be used as the animal models of hemangioma, and provide an ideal platform for the study of hemangioma.

[Key words] hemangioma; endothelial progenitor cell; animal model; nude mice

血管瘤是婴幼儿最常见的血管性良性肿瘤, 其确切的发病机制尚未完全阐明^[1], 治疗方法繁多(如激光、皮质激素、干扰素、手术等), 但缺乏靶向性, 疗效远不尽人意。建立一种理想的血管瘤动物模型, 为血管瘤的研究建立平台成为临床上的迫切需求。本研究利用组织块法体外培养增生期血管瘤内皮细胞, 植入裸鼠皮下, 生长成瘤建立裸鼠血管瘤动物模型。现作报道。

1 材料与方法

1.1 血管瘤内皮细胞培养及鉴定 收集蚌埠医学院第一附属医院整形外科手术切除的婴幼儿增生期血管瘤标本 15 例, 无菌操作剪成 1 mm^3 大小颗粒, 接种于含 M199 培养液的培养瓶底部, 颗粒间距约 5 mm。48 h 后更换培养液, 以后每隔 3 ~ 4 d 更换培养液, 待细胞汇合成片铺满瓶底即可常规传代。期间在相差显微镜下动态观察并记录细胞生长情况, 绘制血管瘤内皮细胞生长曲线。传代期间通过机械刮除法、酶消化法、反复贴壁法对所培养细胞进行纯化。取第 4 代细胞进行性质鉴定。鉴定采用形态学观察法和 CD31、CD34 及第 VIII 因子相关抗原免疫组化染色法(SP 法)。

1.2 血管瘤动物模型的建立 10 只 BALB/c 裸鼠, 雌性、4 ~ 6 周龄、质量 18 ~ 22 g, 购自南京大学

[收稿日期] 2018-08-16 [修回日期] 2019-03-20

[基金项目] 蚌埠医学院第一附属医院科技发展基金项目 (byfykj201721)

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 整形烧伤科, 安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 吴军军(1989-), 男, 硕士研究生。

[通信作者] 张莉, 硕士研究生导师, 主任医师, 教授。E-mail: drzhangli65@163.com

动物研究中心。将体外培养的 3~6 代血管瘤内皮细胞浓集, 达到 $3 \times 10^8/\text{mL}$, 然后用注射器植入 10 只裸小鼠双侧胸壁、双侧腰部皮下组织内, 每处约 0.1 mL, 每只 4 处, 共 40 处。植入完成后自然生长, 每周定期观察移植瘤生长情况。于移植后第 1、2、4、8 周用游标卡尺测量肿瘤最大直径 a 及横径 b, 根据公式 $V = \pi/6 \times a \times b^2$ 估算肿瘤体积变化。

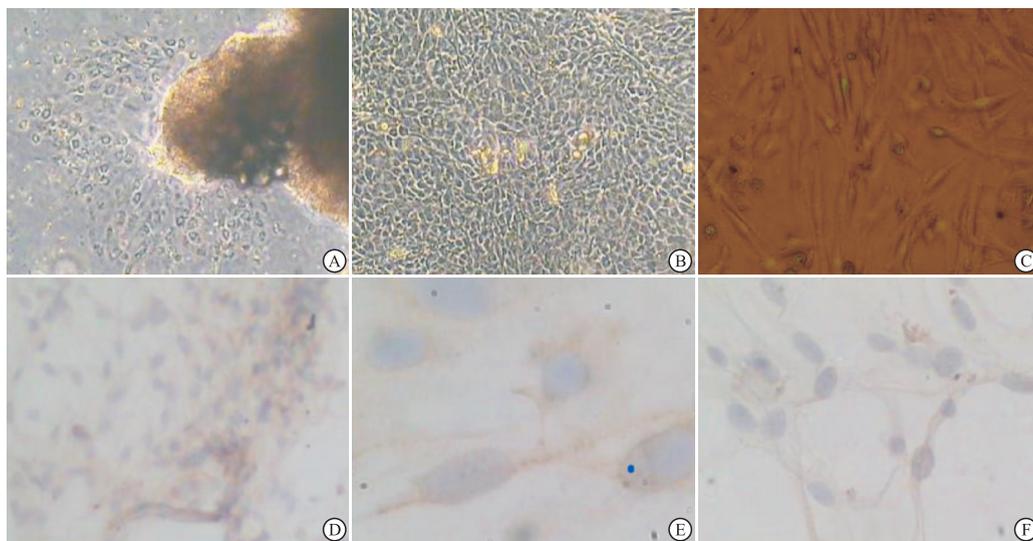
1.3 种植瘤的鉴定, CD31、CD34 的免疫组织化学检测及阳性细胞判定 第 8 周、12 周分别切取瘤体组织, 同时取裸鼠肌肉组织作为阴性对照, 均进行切片鼠抗人 CD31、CD34 单克隆抗体(西安华美生物技术有限公司提供)免疫组织化学标记, 并做阳性细胞计数。判断标准: 镜下以细胞质出现黄色、棕黄色、棕褐色颗粒为阳性, 高倍镜下取 4 个不同视野, 各计数 100 个细胞, 按阳性细胞所占的百分率分为

- ~4+, 无阳性细胞为阴性表达(-), 阳性细胞 < 10% 为 +, 阳性细胞占 10%~50% 为 2+, 阳性细胞占 >50%~75% 为 3+, 阳性细胞 >75% 为 4+。

2 结果

2.1 血管瘤内皮细胞体外培养的情况

2.1.1 细胞形态和鉴定 接种 48~72 h 后内皮细胞从组织块边缘成团游出, 贴壁生长, 细胞呈圆形、椭圆形或多角形, 饱满, 边界清楚, 折光性强, 胞膜完整, 细胞核呈圆或椭圆形, 居中。2~3 周后内皮细胞铺满培养瓶瓶底, 呈单层分布, 呈接触抑制生长特性, 形成典型“铺路卵石状”排列。细胞质或膜中有明显的棕黄色颗粒沉着, 细胞核无染色, 表明第 VIII 因子相关抗原、CD31 和 CD34 染色均呈阳性表达(见图 1)。



A: 72 h 细胞游出时的状况; B: 14 d 时铺满培养瓶的状况; C: 荧光显微镜下观察; D: 第 VIII 因子相关抗原染色; E: Cd34 染色; F: CD31 染色

图 1 细胞形态和免疫组织化学染色

2.1.2 细胞计数和细胞生长曲线 根据细胞计数结果, 绘制第 3 代、第 7 代血管瘤内皮细胞生长曲线。第 3 代血管瘤内皮细胞的生长曲线呈“S”形, 细胞数量在接种后 6~7 d 进入快速增殖期, 第 10 d 左右细胞数量达到高值, 此后进入平台期, 观察期间未见明显的衰退期。第 7 代血管瘤内皮细胞生长曲线与第 3 代细胞生长曲线有所区别, 走势较陡直, 接种第 3~4 天细胞快速增殖, 第 6~7 天数量达到高值, 此后细胞数量进入持续时间较长的稳定期即平台期; 从血管瘤内皮细胞的生长曲线看出, 第 7 代细胞和第 3 代细胞生长情况差别较大。笔者推测可能是由于经反复传代后细胞的性状发生了改变, 有可能 7 代以后细胞已不具备内皮细胞的生长特性

(见图 2)。

2.2 血管瘤内皮细胞移植裸鼠皮下移植肿瘤生长情况 在模型建立 8 周时间, 有 1 只裸鼠出现质量减轻、活动较少、精神萎靡, 其余小鼠均存活良好, 食欲旺盛、反应敏捷、活动有力。所形成的瘤体呈浅粉红色, 质韧, 切开表皮发现瘤体被包膜包绕, 边界清楚, 血供丰富, 出血较多。所种 40 处瘤体存活率 87.5% (35/40)。种植瘤体积生长情况见表 1、图 3。在第 1 周内, 种植的内皮细胞所形成的包块体积进行性缩小至完全吸收。第 2 周以后, 发现有瘤体渐进性增长, 第 2 周到第 4 周时间内瘤体体积增长缓慢, 4~8 周瘤体体积增长较快。8 周以后种植瘤体再次进入生长缓慢期, 瘤体相继缓慢缩小, 颜色变

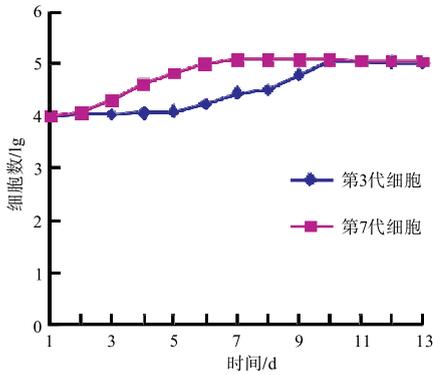
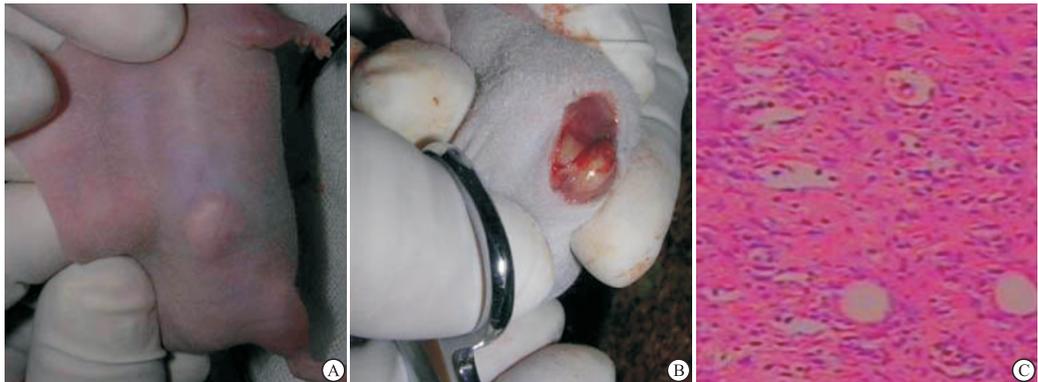


图2 血管瘤内皮细胞生长曲线

浅,第12周发现瘤体体积只有8周时的2/3,切开瘤体多是纤维和脂肪细胞,残存少量血管瘤内皮细胞和扩张的血管。这与临床观察到的血管瘤的发展过程极其相似:早期增殖极其迅速,常在出生后1个月内发病,6个月内瘤体迅速增大,此后的6个月增长速度有所减慢,从1岁左右开始血管瘤大多开始趋向消退,50%在5岁以内完全消退不留任何痕迹。另有50%血管瘤消退后可残留瘢痕、纤维、脂肪组织和扩张血管等。



A、B: 种植瘤后2个月大体观; C: 瘤体光镜所见: 可见典型的血管瘤组织表现, 内皮细胞数目多、密度大、增生活跃, 形成团块状, 偶见核分裂相, 毛细血管腔较密集, 部分管腔被阻塞

图3 裸鼠人血管瘤种植瘤模型的建立

5.56(4+)和 $92.53 \pm 5.01(4+)$;第12周,其阳性指数分别为 $72.23 \pm 10.74(3+)$ 和 $65.89 \pm 18.69(3+)$ 。肌肉组织阴性表达。表明瘤体来源于体外培养的血管瘤内皮细胞,而非裸鼠组织(见图5)。

3 讨论

3.1 血管瘤动物模型的现状 近年来,制作血管瘤动物模型成为研究血管瘤的一种理想方法^[2]。HOAK等^[3]1971年给同源小鼠移植血管内皮瘤而制作出血管瘤模型,但这种肿瘤为混合细胞型,其中的非内皮细胞可能有助于肿瘤形成;PRIMO等^[4]成功利用多瘤病毒基因片段为载体,建立起血管瘤动物模型,并已经形成特定的F-2和Py-4-1系细胞,但

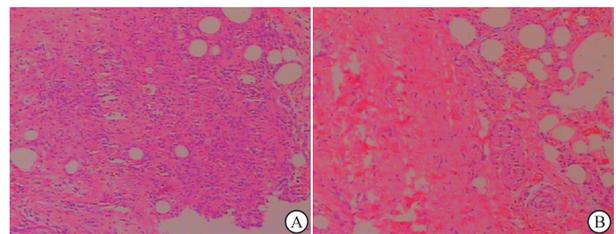
表1 肿瘤体积增长情况($\bar{x} \pm s$)

饲养时间/周	瘤体体积/cm ³
1	0.022 ± 0.001
2	0.295 ± 0.027
4	0.357 ± 0.032
8	0.918 ± 0.043
12	0.692 ± 0.103

2.3 切取瘤体的鉴定情况

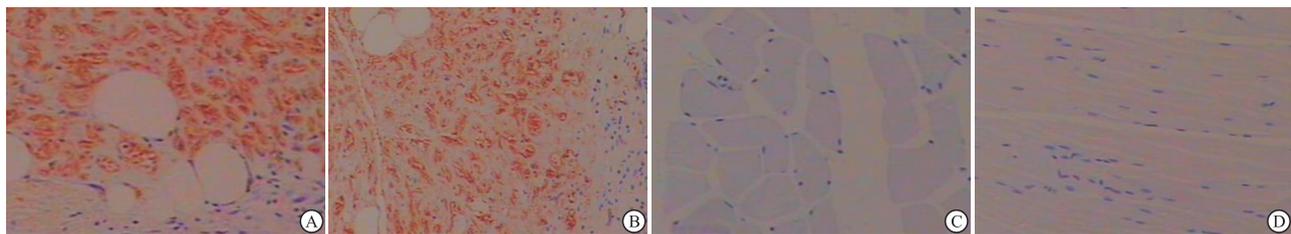
2.3.1 光镜下观察 切取的瘤体组织行切片HE染色,光镜下可见内皮细胞密集,呈团块样增生,形成条索或管状结构,另有纤维组织和少量脂肪细胞。内皮细胞质被染成红色,核被染成蓝紫色,偶见核分裂。正常的裸鼠肌肉组织作为对照,发现其细胞核分布均匀,无深染。未见明显细胞核聚集分布,细胞增殖正常(见图4)。

2.3.2 免疫组织化学检查 在光学显微镜下观察发现棕黄色颗粒满视野弥漫性分布,呈阳性表达。第8周,CD31和CD34阳性指数分别为 $92.43 \pm$



A: 含瘤体; B: 正常
图4 裸鼠肌肉组织HE染色光镜下情况

这种方法建立的模型表现的是恶性肿瘤的特点,常导致裸鼠死亡,其生物学特性与临床人血管瘤有本质的区别;2004年有学者^[5]应用婴儿增生期毛细血管瘤,将瘤体组织直接转种于裸小鼠皮下,动态观察瘤体生长情况及组织学变化,获得成功,其模型的建立



A、B: 为瘤体的CD31和CD34表达,呈强阳性;C、D: 为裸鼠正常组织的CD31和CD34表达,呈阴性

图5 血管瘤内皮细胞免疫组织化学

虽然能客观、真实地反映人血管瘤临床发展过程,但由于血管瘤组织在裸鼠体内延续了其原来供体组织的生长进程,对于血管瘤的发生亦未能完全重现。虎小毅等^[6]通过直接选择合适标本体外培养出血管瘤内皮细胞注射于裸鼠皮下,建立血管瘤模型获得成功。为此本实验通过组织块法血管瘤内皮细胞的体外培养,获得大量增殖的纯化的血管瘤内皮细胞移植于裸鼠皮下,建立真正反映血管瘤发生、发展的动物模型。

3.2 内皮细胞体外培养 来源不同的血管瘤细胞生物学性质有很大区别。尚未见将人血管瘤内皮细胞克隆成系的报道。MEININGE 等^[7]研究发现培养的血管瘤内皮细胞可增加干细胞因子的释放。干细胞因子对肥大细胞有化学趋化作用,可以解释血管瘤中有大量肥大细胞聚集。而肥大细胞聚集后脱颗粒,产生许多刺激血管瘤内皮细胞生长的物质。同时,在培养中肥大细胞颗粒可引起人毛细血管内皮细胞的增殖。对培养的其他毛细血管内皮细胞的研究也证实内皮细胞可以分泌多种生长因子以及部分细胞外基质成分,这可以解释为什么纯化的内皮细胞能在体外形成血管^[8]。血管瘤以内皮细胞增殖为特征,因此培养血管瘤内皮细胞就要求尽可能地去除内皮细胞以外的其他细胞。血管瘤内皮细胞有两种主要的培养方法:酶消化法和组织块法^[9]。其中消化法得到的内皮细胞中杂细胞比较多,而组织块培养法培养的细胞从组织块四周放射性贴壁长出,此方法获得的杂细胞比较少^[10]。

与传统的消化法相比,组织块法培养血管瘤内皮细胞细胞损伤较小,便于细胞贴壁生长,避免了因组织消化而混入大量的成纤维细胞以及其他细胞^[11],提高了该细胞的纯度。尽管如此,用组织块法培养的内皮细胞还必须经过纯化。另外可以利用内皮细胞表达一些特异性的标志物如 CD34、I 相关抗原等用免疫磁珠或流式细胞仪来分离细胞,这种方法获得的细胞纯度高,所需时间短,并且不影响进一步的研究^[12]。但是这两种方法比较昂贵,不利于

推广。

一般异种组织种植到裸鼠体内,经过 2~3 周的恢复期,这期间移植体重新建立血供,早期因缺血缺氧发生的细胞变性转归为功能状态重新开始恢复,并进入增殖期^[13-15]。我们的试验研究表明种植血管瘤内皮细胞至裸鼠皮下亦存在类似的情况,但是时间上与直接种植组织的恢复时间要提前到 1 周,可能是由于细胞增殖活性不同而出现不同的恢复时间,再加上血管瘤内皮细胞本身可以促进血管生成,血供易于建立有关。种植成活瘤体有着类似临床人血管瘤特殊的增生、消退生物学特性过程。

本研究在临床上收集增生期婴幼儿毛细血管瘤标本通过组织块法体外培养,然后再纯化浓集血管瘤内皮细胞转种于裸小鼠皮下建立血管瘤动物模型,成活的血管瘤瘤体与原人体血管瘤比较,其血管瘤的生物学和病理特征基本一致,可以观察到从发生到迅速增殖再到消退的类似临床人血管瘤演变过程。组织块法增生期血管瘤裸鼠动物模型的建立为进一步阐明现有疗法的作用机制并对血管瘤的新疗法的发现提供一较理想平台。

[参 考 文 献]

- [1] BRUCKNER AL, FRIEDEN IJ. Hemangioma of infancy[J]. J Am Acad Dermatol, 2003, 48(4):477.
- [2] TAN ST, HASANQ, VELICKOVIC M, et al. A Novel *in vitro* human model of hemangioma[J]. Mod Pathol, 2000, 13(1):92.
- [3] HOAK JC, WARNER ED, CHENG HF, et al. Hemangioma with thrombocytopenia and microangiopathic anemia (Kasabach-Merritt syndrome): an animal model[J]. J Lab Clin Med, 1971, 77(6):941.
- [4] PRIMO L, ROCA C, FERRANDI C, et al. Human endothelial cells expressing polyoma middle T induce tumors [J]. Oncogene, 2000, 19(32):3632.
- [5] TANG Y, LIU W, YU S, et al. A novel *in vivo* model of human hemangioma; xenograft of human hemangioma tissue on nude mice [J]. Plast Reconstr Surg, 2007, 120(4):869.
- [6] 虎小毅, 杨壮群, 宋勇, 等. 细胞悬液接种法血管瘤裸鼠动物模型的建立[J]. 中国美容医学, 2008, 17(7):1012.

- [16] HUANG Y, LI LP. Progress of cancer research on astrocyte elevated gene-1/Metadherin (Review) [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(2):493.
- [17] SHI X, WANG X. The role of MTDH/AEG-1 in the progression of cancer [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(4):4795.
- [18] CHEN X, DONG K, LONG M, *et al.* Serum anti-AEG-1 autoantibody is a potential novel biomarker for malignant tumors [J]. *Oncol Lett*, 2012, 4(2):319.
- [19] LIU H, SONG X, LIU C, *et al.* Knockdown of astrocyte elevated gene-1 inhibits proliferation and enhancing chemo-sensitivity to cisplatin or doxorubicin in neuroblastoma cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2009, 28:19.
- [20] EMDAD L, LEE SG, SU ZZ, *et al.* Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) functions as an oncogene and regulates angiogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(50):21300.
- [21] SARKAR D, PARK ES, EMDAD L, *et al.* Molecular basis of nuclear factor-kappa B activation by astrocyte elevated gene-1 [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(5):1478.
- [22] SONG L, LI W, ZHANG H, *et al.* Over-expression of AEG-1 significantly associates with tumour aggressiveness and poor prognosis in human non-small cell lung cancer [J]. *J Pathol*, 2009, 219(3):317.
- [23] PAN Y, GUO X, YANG Z, *et al.* AEG-1 activates Wnt/PCP signaling to promote metastasis in tongue squamous cell carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(2):2093.
- [24] WEI Y, HU G, KANG Y. Metadherin as a link between metastasis and chemoresistance [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(14):2132.
- [25] HUANG W, YANG L, LIANG S, *et al.* AEG-1 is a target of perfosine and is over-expressed in gastric dysplasia and cancers [J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58(10):2873.
- [26] HATFIELD S, RUOHOLA-BAKER H. microRNA and stem cell function [J]. *Cell Tissue Res*, 2008, 331(1):57.
- [27] LEE SG, SU ZZ, EMDAD L, *et al.* Astrocyte elevated gene-1 activates cell survival pathways through PI3K-Akt signaling [J]. *Oncogene*, 2008, 27(8):1114.
- [28] SU P, ZHANG Q, YANG Q. Immunohistochemical analysis of Metadherin in proliferative and cancerous breast tissue [J]. *Diagn Pathol*, 2010, 5:38.
- [29] WANG J, CHEN X, TONG M. Knockdown of astrocyte elevated gene-1 inhibited cell growth and induced apoptosis and suppressed invasion in ovarian cancer cells [J]. *Gene*, 2017, 616:8.
- [30] QIAO W, CAO N, YANG L. microRNA 154 inhibits the growth and metastasis of gastric cancer cells by directly targeting MTDH [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(3):3268.
- [31] LI J, YANG L, SONG L, *et al.* Astrocyte elevated gene-1 is a proliferation promoter in breast cancer via suppressing transcriptional factor FOXO1 [J]. *Oncogene*, 2009, 28(36):3188.
- [32] KE ZF, MAO X, ZENG C, *et al.* AEG-1 expression characteristics in human non-small cell lung cancer and its relationship with apoptosis [J]. *Med Oncol*, 2013, 30(1):383.
- [33] CARMELIET P, JAIN RK. Angiogenesis in cancer and other diseases [J]. *Nature*, 2000, 407(6801):249.
- [34] SRIVASTAVA J, SIDDIQ A, EMDAD L, *et al.* Astrocyte elevated gene-1 promotes hepatocarcinogenesis: novel insights from a mouse model [J]. *Hepatology*, 2012, 56(5):1782.

(本文编辑 姚仁斌)

(上接第 569 页)

- [7] MEININGER CJ, BRIGHTMAN SE, KELLY K A, *et al.* Increased stem cell factor release by hemangioma-derived endothelial cells [J]. *Lab Invest*, 1995, 72(2):166.
- [8] PETERSON AW, CALDWELL DJ, RIOJA AY, *et al.* Vasculogenesis and angiogenesis in modular collagen-fibrin microtissues [J]. *Biomater Sci*, 2014, 2(10):1497.
- [9] 稂翠玲, 孙斌, 雷红召, 等. 血管瘤血管内皮细胞体外分离纯化方法的优化 [J]. *中国美容医学*, 2018, 27(4):65.
- [10] 李攀登, 陈润芳, 张莉, 等. 婴幼儿增生期血管瘤内皮细胞观察: 培养、鉴定及生长状况 [J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(51):8276.
- [11] CHALAJOUR F, TREEDE H, EBRAHIMNEJAD A, *et al.* Angiogenic activation of vascular endothelial cells in aortic valve stenosis [J]. *Exp Cell Res*, 2004, 298(2):455.
- [12] BALAN S, KALE VP, LIMAYE LS. A simple two-step culture system for the large-scale generation of mature and functional dendritic cells from umbilical cord blood CD34⁺ cells [J]. *Transfusion*, 2009, 49(10):13.
- [13] 米莹. 自噬抑制 2-DG 诱导的内皮细胞凋亡及自噬在婴幼儿血管瘤中的活性研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2016.
- [14] HARBI S, PARK H, GREGORY M, *et al.* Arrested development: infantile hemangioma and the stem cell teratogenic hypothesis [J]. *Lymphat Res Biol*, 2017, 15(2):153.
- [15] 徐艳朋, 俞松, 彭岗, 等. Raf-1 和 p-ERK 在血管瘤裸鼠移植模型中的表达及意义 [J]. *中华小儿外科杂志*, 2015, 36(12):936.

(本文编辑 刘梦楠)