

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00147

组织块结合酶消化法培养婴幼儿血管瘤内皮细胞

廖洪跃¹, 邢新^{1*}, 欧阳天祥², 郭伶俐¹, 李军辉¹, 薛春雨¹, 袁斯明³, 李鸣¹

1. 第二军医大学长海医院整形外科, 上海 200433
2. 上海交通大学医学院新华医院整形外科, 上海 200092
3. 南京军区总医院烧伤整形科, 南京 210002

[摘要] **目的:**探讨血管瘤内皮细胞体外培养的方法并观察其生物学特性。**方法:**收集新鲜手术切除的婴幼儿血管瘤标本, 采用组织块结合酶消化法培养内皮细胞, 免疫组化 EnVision 法对培养的细胞进行鉴定; 流式细胞仪 FITC-CD34 检测内皮细胞纯度; 相差显微镜下观察血管瘤内皮细胞的生物学特性。**结果:**共收集血管瘤标本 14 例, 有 8 例成功培养出内皮细胞, 内皮细胞呈现两种形态: 多角形和梭形, 经免疫组化鉴定为内皮细胞; 培养的细胞中 CD34⁺ 细胞数为 76.28%; 血管瘤内皮细胞有明显的“管腔形成”。**结论:**组织块结合酶消化法能成功培养较纯的婴幼儿血管瘤内皮细胞, 培养的内皮细胞具有某些生物学特性。

[关键词] 血管瘤; 婴幼儿; 内皮细胞; 细胞培养; 组织块结合酶消化法

[中图分类号] R 732.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)02-0147-04

Explant combined with trypsin-digestion for culture of endothelial cells from infantile hemangiomas

LIAO Hong-yue¹, XING Xin^{1*}, OUYANG Tian-xiang², GUO Ling-li¹, LI Jun-hui¹, XUE Chun-yu¹, YUAN Si-ming³, LI Ming¹

1. Department of Plastic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Plastic Surgery, Xinhua Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092
3. Department of Burn and Plastic Surgery, Nanjing General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Nanjing 210002

[ABSTRACT] **Objective:** To explore a novel method for cultivation of the endothelial cells (EC) from infantile hemangiomas (IH) *in vitro* and observe the biological character of cultured endothelial cells. **Methods:** Fresh operative specimens were obtained from infantile hemangiomas. The endothelial cells of IH were cultured by explant combined with trypsin-digestion technique. Immunohistochemical staining of EnVision method was carried out to identify the cultured cells. The purity of endothelial cell was examined by flow cytometry analysis of FITC-CD34. The biologic characters of endothelial cells were observed under inverted phase contrast microscope. **Results:** Endothelial cells were successfully cultured from 8 IH specimens of all the 14 explants. The morphology of cultured endothelial cells included two types: polygonal cells and fusiform cells. The cultured cells were homogenously positive for EC markers-vWF or CD34, indicating their EC origin. Tube formation was found in endothelial cells of IH. The proportion of CD34⁺ cells was 76.28% in cultured endothelial cells as detected by flow cytometry analysis. **Conclusion:** ECs can be successfully isolated and cultured from infantile hemangiomas by explant combined with trypsin-digestion technique; the cultured cells have some characters of endothelial cells.

[KEY WORDS] hemangioma; infantile; endothelial cells; cell culture; explant combined with trypsin-digested technique

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(2):147-150]

血管瘤是婴幼儿最常见的良性肿瘤, 约有 4%~12% 白种新生儿出现血管瘤, 男女发病比例为 1:(3~5), 早产低体重儿发病率更高, 可高达 23%。目前血管瘤发病机制不清楚, 研究显示血管内皮细胞异常增殖、大量微血管形成是婴幼儿血管瘤最显

著特征。体外培养血管瘤内皮细胞是揭示血管瘤发病机制的重要步骤, 常规血管瘤组织块培养方法存在内皮细胞产量低、内皮细胞分离困难、杂细胞污染重等难题, 本研究采用组织块结合酶消化方法培养血管瘤内皮细胞, 获得较高纯度的内皮细胞, 并观察

[收稿日期] 2008-08-04 **[接受日期]** 2008-11-20

[基金项目] 国家自然科学基金(30571928). Supported by National Natural Science Foundation of China(30571928).

[作者简介] 廖洪跃, 博士生, 现在武警江西总队医院烧伤整形科, 邮编: 330030. E-mail: hyliao@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-81874895, E-mail: xingxin56@yahoo.com.cn

到血管瘤内皮细胞的某些生物学特性,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 标本来源 收集第二军医大学长海医院和上海新华医院 2007 年 1~12 月手术切除的血管瘤标本,家属对本研究知情同意,选择年龄<12 个月且未进行任何治疗的 14 例标本进行细胞培养。

1.2 培养液和试剂 Gibco M199 培养基、胰蛋白酶、青霉素+链霉素、Gibco 胎牛血清(Invitrogen 公司),碱性成纤维细胞生长因子(Pepro 公司),肝素钠(上海伯奥生物科技有限公司),鼠抗人Ⅷ因子、鼠抗人 CD34(Dako 公司),FITC-CD34(Caltag 公司),FAC-SCalibur 型流式细胞仪(Becton Dickinson 公司),计算机数据处理软件(BD 公司 Cellquest 软件)。

1.3 血管瘤内皮细胞分离和培养 (1)手术切除的血管瘤组织标本,无菌条件下置于 D-Hank 液试管中,4℃保存,运至细胞培养室。(2)用 D-Hank 液将血管瘤标本的凝血块和坏死组织冲洗干净,再用 PBS 液冲洗至肉眼观察冲洗液颜色清亮,无浑浊及脱落组织。(3)用眼科剪和镊去除多余的皮肤及脂肪,选择瘤体组织,适当修剪成 1~2 cm³的组织块,放入预温 37℃的 0.25%胰蛋白酶中,37℃水浴箱中振荡消化 10~20 min,加入含 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)培养液中中止消化。(4)将消化后的组织块修剪成 1 mm³大小的微粒,接种于事先用 1%明胶包被的培养皿内,静置 10 min。然后加入约 0.5 ml 完全内皮细胞培养基(成分为 M199 培养基、20%胎牛血清、25 ng/ml 碱性成纤维细胞生长因子、100 mg/L 肝素、10 IU/L 青霉素、100 mg/L 链霉素),仅使培养液刚刚湿润组织块,勿使组织块浮起,置于体积分数为 5%CO₂、37℃培养箱内孵育。(5)24 h 后补充 0.5 ml 内皮细胞培养基,使培养液缓慢浸润组织块,置培养箱继续培养。5 d 后更换培养液。(6)接种后 1 周去除组织块,倒置相差显微镜下确认内皮细胞岛,用细胞刮去除非内皮细胞,更换培养液后继续培养。每 3~4 d 更换培养液 1 次。(7)细胞汇合成片铺满培养皿时按 1:3 比例传代培养。

1.4 血管瘤内皮细胞形态学观察、鉴定及纯度检测

1.4.1 形态学观察 倒置相差显微镜下观察血管瘤内皮细胞生长情况和形态学特征,并用数码相机记录观察的结果。

1.4.2 免疫组化 EnVision 法鉴定 将培养成功的原代血管瘤内皮细胞接种至 3.5 cm 培养皿中制作细胞爬片,培养 1 周后,取出细胞爬片,PBS 冲洗 2 遍,95%乙醇室温下固定 15 min,0.3%的双氧水室

温下孵育 10 min,PBS 冲洗,然后以正常血清室温下封闭 10 min,分别加入第Ⅷ因子相关抗原鼠抗人抗体(工作浓度 1:200)和 CD34 鼠抗人抗体(工作浓度 1:200)4℃过夜,PBS 冲洗后鼠抗兔二抗室温孵育 30 min。PBS 冲洗后,加入链霉菌抗生物素-过氧化氢酶溶液室温下孵育 30 min。PBS 冲洗,DAB 显色,脱水,光学显微镜下观察并拍照。

1.4.3 流式细胞仪 FITC-CD34 检测内皮细胞纯度 传代的血管瘤内皮细胞长满培养皿后,吸除培养液,用 PBS 清洗 2 遍,用预温 37℃的 0.25%胰蛋白酶消化 2 min,相差显微镜下观察内皮细胞皱缩变圆,加入含 10% FBS 的培养基中止消化,吹打细胞,使成单细胞悬液,离心(222×g, 5 min)收集细胞,倒掉培养基,PBS 洗 1 次,调整细胞密度为 1×10⁶/ml;离心后去掉上清液,先加入 1 800 μl A 溶液(NP40+胰酶+四氯酸精氨)作用 10 min;然后加入 1 500 μl B 溶液(胰酶抑制酶液+RNase)作用 10 min,最后加入 1 500 μl C 溶液(CD34-FITC 抗体)作用 15 min;测定前将样品用 200 目尼龙膜过滤;将样品加入 FCM 的样品室,以激发波长 488 nm 测定细胞荧光强度。

2 结果

共培养血管瘤标本 14 例,有 8 例标本成功培养出内皮细胞。组织块接种后最早 48 h 就可见细胞从组织块边缘爬出(图 1A)。爬出的细胞有 2 种形态:一种是成团的多角形细胞,细胞紧密排列,细胞境界清晰,细胞膜明显,胞核较淡;另一种呈梭形,细胞形状稍长,疏松排列,呈放射状游出组织块,细胞境界清晰,胞膜明显,胞核较淡。3~5 d 内皮细胞爬出量最丰富,去除组织块后,多角形细胞向四周扩张生长,但生长速度较慢;梭形细胞呈现漩涡式生长,生长速度较快,5~7 d 后细胞密度较高,相互融合后,梭形细胞转变为类圆形或多角形(图 1D),细胞排列较紧密,生长速度减慢。2 种形状的细胞在生长时有明显的“管腔形成”现象,尤其是在生长活跃的边缘区域(图 1C),细胞培养 3~4 周后长满培养皿(图 1B)。细胞传代培养后,生长速度较慢,传代 3 代后的细胞形态发生改变,成为长梭形,不再具有铺路石样形态,呈现衰退迹象,并有凋亡现象出现。

免疫组化 EnVision 法检测培养的细胞第Ⅷ因子相关抗原和 CD34 抗原呈阳性反应,细胞膜和胞质有明显的阳性染色,细胞核无染色(图 2),证实为内皮细胞来源的细胞。流式细胞仪 FITC-CD34 检测培养细胞 CD34⁺细胞数为 76.28%(图 3),表明传代后的内皮细胞纯度较高。

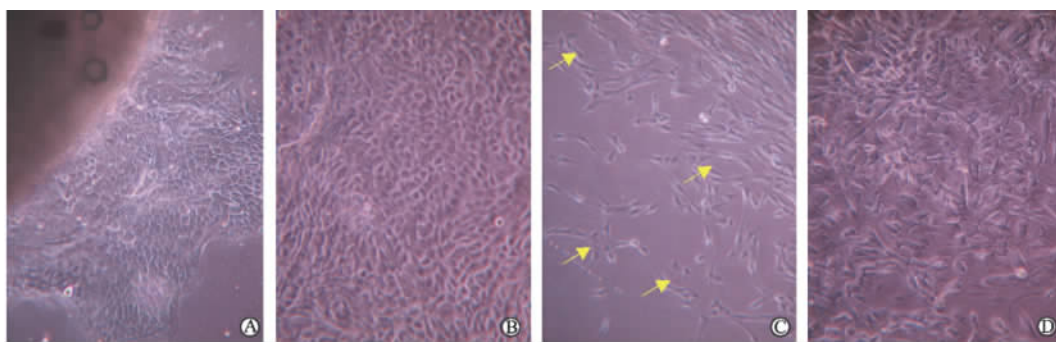


图 1 体外培养的血管瘤内皮细胞

Fig 1 Cultured endothelial cells from infantile hemangioma

A: Endothelial cells grow out from the brow of explants 3 days after embedding; B: After 3 weeks' culture, polygonal endothelial cells grow out in most dishes, exhibiting the characteristic cobblestone morphology; C: Tube formation occurs in the brim of proliferative area of fusiform endothelial cells (Arrowheads); D: Fusiform endothelial cells attain a typical cobblestone morphology with increased cellular density. Original magnification: $\times 80$

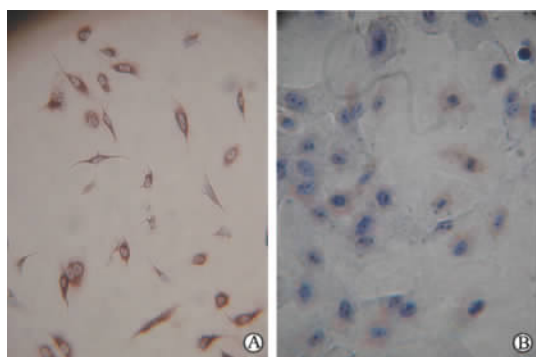


图 2 体外培养的细胞免疫组化鉴定

Fig 2 Immunohistochemical staining results of endothelial cells cultured from infantile hemangiomas

A: Cultured cells exhibit punctuate cytoplasmic staining with anti-vWF; B: The blood vascular-specific marker CD34 is positive on cell membrane of cultured cells. Original magnification: $\times 200$

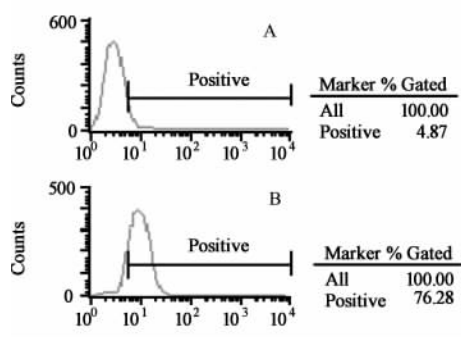


图 3 流式细胞仪检测体外培养的中 CD34⁺ 细胞数的结果

Fig 3 Expression of CD34⁺ on hemangioma endothelial cell surface as detected by flow cytometry

A: Negative control; B: Expression rate of CD34⁺ cells on hemangioma endothelial cells

3 讨论

3.1 血管瘤内皮细胞的分离培养 通过不断摸索

和改进,人们逐渐找到适合和促进微血管内皮细胞生长的条件,如在培养基中添加牛脑提取物、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、表皮细胞生长因子(EGF)、胰岛素、肝素、氢化可的松、抗真菌药物等^[1]。但长期困扰血管瘤内皮细胞体外培养的杂细胞污染,目前仍没有很好的解决方案。文献介绍了多种纯化内皮细胞的方法,包括梯度离心法^[2]、机械刮除法^[3]和 VEGF 培养法^[4]等,这些方法单独使用效果都不理想。近年来,新出现免疫磁珠法是一种较理想的分离方法,但在实际应用中,如果磁珠分选纯化的内皮细胞密度达不到 $10^4/\text{cm}^3$ 以上,细胞培养很难成功。血管瘤内皮细胞刚从组织块中分离出来,通常数目较少,活力也差,因此免疫磁珠法还有待进一步完善。

传统组织块法培养血管瘤内皮细胞,组织块为混合瘤体、纤维脂肪组织的复合体,瘤体成分被纤维脂肪组织包裹,内皮细胞要从组织块边缘游出有一定的障碍,而且还包括成纤维细胞在内的其他杂细胞混杂其中。如能够尽可能去除瘤体外的纤维脂肪组织,一方面可以给内皮细胞游出创造一个无障碍的环境,另一方面还能够减少杂细胞的污染,提高内皮细胞纯度。根据上述原理,我们首先使用胰蛋白酶消化组织块 15~20 min,除去包绕在瘤体外的组织,然后将纯净的瘤体组织修剪成微粒接种至细胞培养皿。文献^[5]报道肝素具有促进内皮细胞生长和抑制成纤维细胞的作用,并且这种作用与肝素浓度正相关。我们在内皮细胞培养液中添加 100 mg/L 肝素可以促进内皮细胞游出,同时抑制成纤维细胞的游出,有利于纯化内皮细胞。内皮细胞和成纤维细胞生长特性不同,内皮细胞在组织块接种后 3~5 d 最先爬出,成纤维细胞通常要在 1 周后游出,利用内皮细胞和成纤维细胞生长特性的时间差,在成纤

维细胞未游出之前去除组织块,能够减少成纤维细胞的污染。通过这些综合措施,每个培养皿中总有3~4个组织块游出外形均是卵圆形或多角性的纯内皮细胞,无其他细胞混杂,最后采用机械刮除法清除混有杂细胞的内皮细胞群落,培养皿内保留纯内皮细胞群落。纯化的内皮细胞培养3周左右,可基本长满培养皿,即可传代扩大培养。血管瘤内皮细胞传代后生长速度不如原代,传代培养3代后细胞变形,并有细胞凋亡出现。组织块结合酶消化法可以培养出纯度较高的血管瘤内皮细胞,是一种简单实用而又有效的方法。

3.2 血管瘤内皮细胞生物学特性观察 内皮细胞异常是婴幼儿血管瘤发生的核心因素,研究显示,婴幼儿血管瘤内皮细胞能够表达 GLUT1^[6]、Lewis Y Ag(LeY)、FcR γ II、merosin、IDO、淋巴内皮生长因子 LYVE-1^[7]和 CD133^[8]等抗原。这些抗原分别是胎盘微血管内皮细胞、淋巴内皮细胞和内皮祖细胞特异性抗原。体外培养的血管瘤内皮细胞显示,血管瘤内皮细胞具有摄取 3H-胸腺苷,其克隆性测定显示血管瘤内皮细胞来源于同一祖细胞,而且血管瘤内皮细胞的增殖率是正常真皮微血管内皮细胞的2.5倍,血管瘤内皮细胞的迁移能力是微血管内皮细胞的3.5倍,并且这种迁移能力不会被血管抑制剂——内皮他丁所抑制^[9]。我们体外培养的血管瘤内皮细胞有两种形态,一种呈梭状,另一种是多角形,与赵曜等^[10]报道的培养的颅内海绵状血管瘤内皮细胞相似,两种形态细胞边界清楚,胞质丰富,核圆形或椭圆形,居中,梭形细胞分散排列,生长活跃,生长速度快,呈现漩涡式生长方式,当细胞达到一定密度时,形态转变为多角形;多角形细胞团块状排列,向周边扩散样生长,生长较缓慢,原代细胞生长3周后,逐渐停止增殖,进入相对平稳期,持续大约1周左右,逐渐发生凋亡。血管瘤内皮细胞生长方式与血管瘤临床表现有必然的联系,婴幼儿血管瘤瘤体呈现为凹凸不平状隆起,类似彼此相连的山峰,在两个隆起之间有红色凹陷皮肤,这可能是因两种不同形态内皮细胞及其不同生长速度所致。体外培养的血管瘤内皮细胞还存在一个明显的特征:“管腔形成”,尤其是在细胞分裂增殖活跃的边缘区域。1982年,Mulliken等^[11]首先描述了体外培养的血管瘤内皮细胞有管腔形成现象,以后在血管瘤体外培养模型中发现,增殖期血管瘤组织块培养4d就形成明显血管,并且增殖期组织块血管形成速度显著快于消退期和消退完成期的组织块^[12]。管腔形成现象在其

他内皮细胞培养中(如脐静脉内皮细胞)并不明显,推测可能是由于血管瘤内皮细胞来源于微血管内皮细胞及其快速生长所致。

(志谢 南昌大学二附院病理科李里香教授鉴定并审核本文图片,在此表示感谢!)

[参考文献]

- [1] Kråling B M, Bischoff J. A simplified method for growth of human microvascular endothelial cells results in decreased senescence and continued responsiveness to cytokines and growth factors[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1998, 34: 308-315.
- [2] Cha S T, Talavera D, Demir E, Nath A K, Sierra-Honigmann M R. A method of isolation and culture of microvascular endothelial cells from mouse skin[J]. *Microvasc Res*, 2005, 70: 198-204.
- [3] Priebe M, Paulsen F, Jahnke T, Grimm J, Heller M, Müller-Hülsbeck S. [Mechanical brush-catheter abrasion method for the isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. First *in vitro* results][J]. *Rofo*, 2001, 173: 955-958.
- [4] Gupta K, Ramakrishnan S, Browne P V, Solovey A, Hebbel R P. A novel technique for culture of human dermal microvascular endothelial cells under either serum-free or serum-supplemented conditions: isolation by panning and stimulation with vascular endothelial growth factor[J]. *Exp Cell Res*, 1997, 230: 244-251.
- [5] Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, 16: 159-178.
- [6] North P E, Waner M, Mizeracki A, Mrak R E, Nicholas R, Kincannon J, et al. A unique microvascular phenotype shared by juvenile hemangiomas and human placenta[J]. *Arch Dermatol*, 2001, 137: 559-570.
- [7] Dadras S S, North P E, Bertocini J, Mihm M C, Detmar M. Infantile hemangiomas are arrested in an early developmental vascular differentiation state[J]. *Mod Pathol*, 2004, 17: 1068-1079.
- [8] Yu Y, Flint A F, Mulliken J B, Wu J K, Bischoff J. Endothelial progenitor cells in infantile hemangioma[J]. *Blood*, 2004, 103: 1373-1375.
- [9] Boye E, Yu Y, Paranya G, Mulliken J B, Olsen B R, Bischoff J. Clonality and altered behavior of endothelial cells from hemangiomas[J]. *J Clin Invest*, 2001, 107: 745-752.
- [10] 赵曜, 谭玉珍, 周良辅, 毛颖, 王海杰, 舒加. 中枢神经系统海绵状血管瘤内皮细胞的分离和培养[J]. *中华实验外科杂志*, 2003, 20: 685-686.
- [11] Mulliken J B, Zetter B R, Folkman J. *In vitro* characteristics of endothelium from hemangiomas and vascular malformations[J]. *Surgery*, 1982, 92: 348-353.
- [12] Tan S T, Hasan Q, Velickovic M, Rüger B M, Davis R P, Davis P F. A novel *in vitro* human model of hemangioma[J]. *Mod Pathol*, 2000, 13: 92-99.

[本文编辑] 尹茶