

人类血管瘤模型的研究现状

宋 波 综述 唐学阳 刘利君 审校

血管瘤是儿科临床常见病。关于血管瘤的病因及发病机制,目前尚无一致的共识。血管瘤类型多样,生长部位广泛,治疗难度较大且效果欠佳^[1]。随着组织培养和实验动物学的发展,国内外学者近年来构建了各种各样的血管瘤模型,为进一步研究血管瘤病因、发病机制和治疗效果提供了良好的实验基础。现就当前各类血管瘤模型的研究现状做一综述。

一、细胞移植类动物模型的构建

1. XPTS-1 细胞系与血管瘤:与正常血管内皮细胞相比,血管瘤内皮细胞内有高表达的 VEGF mRNA,而 VEGF 受体的 mRNA 的表达上没有明显差别。血管内皮生长因子(VEGF)是最强的促肿瘤血管形成因子,其高表达会形成不成熟的、渗出的血管而导致血管瘤发生。血管瘤组织内细胞成分很多,要培养血管瘤内皮细胞就需要除去其他杂细胞。目前培养血管瘤内皮细胞的方法主要有 2 种:消化法和组织块法。组织块法相比于消化法,细胞损伤较小,获得细胞纯度更高^[2]。李鹏^[3]等用组织块法建立婴幼儿血管瘤源性血管内皮细胞系(hemangioma-derived endothelial cell line, HemEC),将其命名为 XPTS-1,并采用异体移植的方法将 HemEC 接种于裸鼠皮下,制作血管瘤动物模型。该模型所得的肿瘤组织与婴幼儿血管瘤的组织病理学特征基本一致,保留了婴幼儿血管瘤的良性肿瘤生长方式,但具有恶性肿瘤的生长速度,实验动物存活时间长,且制作相对简单,可进一步用于研究肿瘤在动物体内的病理演变过程及肿瘤与机体的相互作用和血管瘤治疗方法的选择。

2. Py-4-1 细胞系与血管瘤:Dubios^[4]等在 1991 年成功从转基因小鼠体内由多瘤病毒基因诱导形成的血管瘤中分离培养一个血管瘤内皮细胞系,称为 Py-4-1 细胞系。1994 年, Dubios^[5]等将 Py-4-1 细胞系注射在组织相容性小鼠皮下,结果在注射部位

均形成单发血管瘤,经组织学和血液学检查发现其特征与 Kasabach-Merritt 综合征相似,包括溶血性贫血、血小板减少性紫癜、脾肿大等,因而是一个可以用于研究 KM 综合征的模型,但该模型鼠血管瘤形成后不久就死亡的现象也对进一步研究有一定的影响。

3. 细胞悬液法制作血管瘤:虎小毅^[6]等选择将体外培养的人血管瘤内皮细胞浓集至 1×10^8 个/mL,然后用注射器植入 16 只 BALB/c nu/nu 裸小鼠腹部双侧皮下组织内,每处约 0.2 mL,每只 2 处,于第 7、30、45、60 d 观察,并测定 CD31、Ki-67 等免疫组化。光镜以及 CD31 都显示符合人血管瘤的生物学特性, Ki-67 虽然不完全相符,但与正常组织相比有明显差异($P < 0.01$)。本实验所建立的模型在 60 d 时瘤体大小为 (0.844 ± 0.191) cm,且仍具血管瘤增殖期表现^[3]。我们认为该模型为药物筛选和药效观察等进一步研究提供了充足的时间,是一种较为理想的研究血管瘤的动物模型。

4. 颅内海绵状血管瘤模型:颅内海绵状血管瘤(Cerebral Cavernous Malformations, CCM)是中枢神经系统发病率较高的脑血管疾病。在 CCM 病灶部位,血管内皮生长因子(VEGF)及其他血管生长促进因子表达上调^[7]。杨贵莉^[8]等就提出假说血管内皮生长抑制因子(VEGI)在脑血管内皮细胞中可能被下调亦或是 VEGI 和 VEGF 的平衡失调导致了 CCM 的发展。为了验证他们提出的假说,他们用小鼠脑微血管内皮细胞系(bEnd3 细胞)与 matrigel(从富含胞外基质蛋白的 EHS 小鼠肿瘤中提取出基底膜基质,其主要成分有层粘连蛋白、IV 型胶原、巢蛋白、硫酸肝素糖蛋白,还包含生长因子和基质金属蛋白酶等)的混合物注射到小鼠颅内,制备小鼠颅内 CCM 模型。由于 bEnd3 细胞有高表达 VEGF 而低表达 VEGI 的表达特性被选为实验材料。实验中选单独注射 matrigel 为对照组,在注射 7 d 后实验组出现类似于 CCM 样的血管结构,而对照组未出现。作者后来又利用 HUVEC 细胞(高表达 VEGI)混合 matrigel 注射到小鼠颅内,未见到形成 CCM 样的血

管结构。因此推断 VEGF 低表达与 VEGF 高表达的模式促进 CCM 模型形成,并可将其模型用于 CCM 药物治疗的筛选。

5. 血管瘤内皮细胞与肿瘤细胞共同移植模型: 张文健^[9]等将人的海绵状血管瘤组织分离、培养并纯化后获得血管瘤内皮细胞的 3~6 代细胞,将其单独或与细胞外基质、生长因子等共同接种于免疫缺陷小鼠皮下,都没形成血管瘤。而将人海绵状血管瘤内皮细胞与少量肿瘤细胞共同移植到免疫缺陷小鼠皮下,于 7~10 d 在移植表皮局部形成类似血管瘤的结构,组织学及免疫荧光检查均表明血窦的血管内皮细胞来源于移植的人海绵状血管瘤内皮细胞。作者还通过该模型筛选出 876-3 和平阳霉素对血管瘤的增殖有抑制作用。该模型可为海绵状血管瘤的治疗和药物的筛选提供可靠的实验平台。

二、组织移植类血管瘤模型构建

构建血管瘤组织裸鼠皮下移植模型。1984 年, sasaki^[10]等发现草莓状血管瘤患儿血浆雌二醇水平较正常同龄儿高出 4 倍。程立新^[11]、江成鸿^[12]等认为雌激素对小儿血管瘤的生成有促进作用。因此彭强^[13]等将雌激素受体阳性的血管瘤组织制成组织块,植入 16 只幼裸小鼠,并分为 2 组,实验组在普通鼠食喂养基础上每周肌肉注射雌二醇 0.1 mg。90 d 后,单纯喂养组移植瘤均未存活,而肌注雌二醇组移植瘤存活率 100%,且成活的移植瘤光镜下与原血管瘤组织生物学特点相似,CD34、免疫组化等都符合人毛细血管瘤特性。因而作者认为该模型保留了人类血管瘤的主要生物学特点,是血管瘤基础的临床研究的良好模型。

三、基因相关的血管瘤模型构建

1. 多瘤病毒与血管瘤: 研究发现,怀孕母鼠感染多瘤病毒 (polyomavirus) 后,新生小鼠患血管瘤的概率大大增加,之后有学者对多瘤病毒的基因进行研究,发现其中 PyMT 基因表达的 MT 蛋白与血管瘤形成关系密切^[14]。Lieken^[15]等采用腹腔注射法将多瘤病毒注入日龄 4 d 新生鼠中,成功建立了血管瘤模型,但该模型血管瘤分布广泛,皮肤、肌肉、颅内等都被累及,并最终因为颅内血管瘤不可控的持续性增生而死亡。而后徐骏^[16]等应用 DNA 显微注射法将 PyMT 基因导入小鼠受精卵,并植入母鼠输卵管,观察转基因小鼠表型。用 PCR 法检测目的基因整合情况,并用组织学检查转基因小鼠可疑血管瘤样新生物。最后在移植卵 579 枚、产仔 62 只的情况下有 1 只出现血管瘤样表型,主要位于皮肤、

舌、胃等组织器官的表面。经病理检查证实为异常血管增生,类似海绵状血管瘤结构,PCR 法检测证实小鼠体内有 PyMT 基因。因而得出结论 PyMT 基因整合到小鼠基因组可以导致血管瘤形成。但是该模型转基因小鼠血管瘤获得率低,工序相对复杂,且血管瘤分布广泛,动物存活率低。

2. VEGF 与血管瘤: 由于血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 对血管瘤的形成非常重要,有学者^[17]利用 MFG 逆转录病毒 VEGF 表达质粒 (pMFG-VEGF) 转染 Lac_Z 基因重组的鼠成肌细胞,然后将具有高分泌 VEGF 的大鼠成肌细胞移植入大鼠骨骼肌来制作大鼠血管瘤模型。该实验将 33 只雄性大鼠随机分为两组,对照组 15 只,实验组 18 只。对照组移植重组有 Lac_Z 基因的成肌细胞,实验组移植经 pMFG-VEGF 转染并重组有 Lac_Z 基因的成肌细胞,注射部位在腓肠肌,注射细胞数: $5 \times 10^5/5 \text{ ulPBS}$ 。2 组又各分为 3 个亚组,每组 5 只,分别于第 10、23、43 天取眶后血测 VEGF (ELISA 法),取样后第 2 天处死大鼠,取移植部位肌肉组织行组织学检查。结果提示对照组不形成血管瘤,实验组 V₁₁ 组成瘤率 0% (0/5, 实验组 V₂₄ 组成瘤率 80% (4/5), 实验组 V₄₄ 组成瘤率 100% (5/5)。移植部位形成的血管瘤与临床所见血管瘤非常相似,具有平滑肌、巨噬细胞、内皮细胞,并且移植部位产生血管瘤的血样本中 VEGF 明显高于全血水平。故本实验进一步验证 VEGF 与血管瘤的产生有一定相关性。而许振起^[18]等构建重组腺相关病毒 (rAAV) 介导的人血管内皮细胞生长因子 (hVEGF₁₂₁) 基因 (rAAV-hVEGF₁₂₁), 并进行滴度测定。然后将 rAAV-hVEGF₁₂₁ 注射于小鼠左耳部,右耳部用等体积的磷酸盐缓冲液做对照。基因移植 2 周后左耳开始发红,病理检查证实 2 周后移植部位新生血管内皮细胞逐渐增多,8 周后内皮细胞排列成血窦样,内含红细胞,CD-34 染色提示增生细胞为血管内皮细胞。该实验进一步证实了 VEGF 与血管瘤的形成有相关性。

Kitajima 等^[19]为了调查高表达 VEGF 是否直接导致血管瘤的发生,制作了一个转基因兔模型,该模型肝脏中表达人类 VEGF₁₆₅ 增加。该模型的肝脏比对照组大 2.5 倍,组织学显示肝血窦扩张,且形成粗细不等的血管网。该转基因兔模型还表型出溶血性贫血、血小板减少、脾肿大等类似 Kasabach-Merritt 综合征的表型,所以作者认为该模型可以用于 KM 综合征的进一步研究。

3. 脑海绵状畸形与 CCM 基因: 脑海绵状畸形 (CCMs) 是中枢神经系统的血管病变, 表现为多发的海绵状的充满血液的毛细血管网, 常常导致头痛、癫痫和出血性脑卒中。CCM 可以是散发的或者家族遗传的, 90% 以上的常染色体显性遗传的 CCM 会有以下 3 种基因中的一种突变导致的功能丧失: CCM1/ KRIT1 (krev1 interaction trapped gene 1), CCM2 和 CCM3/ PDCD10 (programmed cell death 10)^[20]。因而后续有选择性敲除 CCM1 或者 CCM2 来期望获得鼠的实验模型, 但是由于脑血管病变的发生率太低, 并且老鼠很快因为动脉狭窄引起循环不能建立最终导致死亡^[21-22]。

McDonald^[23]等后来用 CCM1 和 CCM2 基因分别与错配的有修复缺陷的 Msh -/- 杂合, 得到 CCM1 +/-, Msh -/- 老鼠和 CCM2 +/-, Msh2 -/- 老鼠。其中 CCM1 老鼠出现脑海绵状畸形的概率大大提高, 并且损伤分 3 期, 末期与人的脑海绵状畸形非常相似。而 CCM2 老鼠则没有出现这种表现。因而作者认为可以将 CCM1 老鼠作为在活体中研究 CCM 的发病机制和治疗方法的模型。

四、其他

有学者利用鸡冠和肉垂作为毛细血管瘤模型来研究激光对人毛细血管瘤的治疗, 因为它们的光反射特性、血红蛋白光学特征及含有丰富的毛细血管网等特点与人毛细血管瘤很相似^[24-25]。由于动物肝、脾组织存在大量血窦和内皮细胞, 与海绵状血管瘤类似, 所以有学者将其作为海绵状血管瘤模型, 来研究硬化剂对海绵状血管瘤的治疗^[26]。虽然研究结果显示激光和硬化剂都有一定的治疗效果, 但由于以上 2 种模型均不是真正的血管瘤, 所以它们的应用相当有限。

虽然以上列出多种血管瘤模型, 但目前为止, 对于血管瘤的病因及发病机制仍未获得真正解释, 部分血管瘤的治疗仍然非常困难。各类血管瘤的发病机制和临床特征又各有差异, 目前的血管瘤模型大多都局限于表浅部位, 事实上深部组织血管瘤一旦发生, 将可能带来更大的危害, 如颅内、肌肉及肌间血管瘤等可导致肢体功能障碍, 而又缺乏有效的治疗手段。从以上综述可见, 有必要在前述各种动物模型研究的基础上, 进一步构建相关骨骼肌肉运动系统的深部组织血管瘤动物模型, 为进一步开展相关研究提供载体。

参考文献

- 董倩, 金先庆, 高解春, 等. 小儿肿瘤外科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009, 271-286.
- Chen SF, Fei X, Li SH. A new simple method for isolation of microvascular endothelial cells avoiding both chemical and mechanical injuries [J]. Microvasc Res, 1995, 50(1): 119-128.
- Li P, Xiao XE, Xu Q, et al. Establishment of human infancy hemangioma-derived endothelial cell line XPTS-1 and animal model of human infancy hemangioma [J]. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi, 2011, 46(3): 129-133.
- Dubois NA, Kolpack LC, Wang R, et al. Isolation and characterization of an established endothelial cell line from transgenic mouse hemangiomas [J]. Exp Cell Res, 1991, 196(2): 302-313.
- Dubois-Stringfellow N, Kolpack-Martindale L, Bautch VL, et al. Mice with hemangiomas induced by transgenic endothelial cells. A model for the Kasabach-Merritt syndrome [J]. Am J Pathol, 1994, 144(4): 796-806.
- 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]. 中国美容医学杂志, 2008, 17(7): 1012-1014.
- Hashimoto T, Wu Y, Lawton MT, et al. Coexpression of angiogenic factors in brain arteriovenous malformations [J]. Neurosurgery, 2005, 56: 1058-1065.
- 杨贵莉. VEGF 在颅内海绵状血管瘤病理形成中的作用以及小鼠颅内海绵状血管瘤模型的建立 [D]. 天津: 南开大学, 2011.
- 张文健. 人海绵状血管瘤内皮细胞特性研究和人海绵状血管瘤动物模型的建立 [D]. 中国协和医科大学, 2005.
- Sasaki GH, Pang CY, Wittliff JL. Pathogenesis and treatment of infant skin strawberry hemangiomas: Clinical and in vitro studies of hormonal effects [J]. Plast Reconstr Surg, 1984, 73: 359.
- 程立新, 汤少明, 罗少军, 等. 血管瘤组织中雌激素、雌激素受体表达及临床意义 [J]. 中华整形外科杂志, 2003, 19(1): 42-43.
- 江成鸿, 庄福连, 黄拔瑞, 等. 雌激素促进小儿血管瘤血管生成的体外实验研究 [J]. 中华整形外科杂志, 2007, 23(2): 86-89.
- 彭强, 刘文英, 唐耘漫. 儿童毛细血管瘤裸鼠移植模型的制作研究 [J]. 中华小儿外科杂志, 2004, 25(3): 235-238.
- Garlanda C, Parravicini C, Sironi M, et al. Progressive growth in immunodeficient mice and host cell recruitment by mouse endothelial cells transformed by polyoma middle-

- sized T antigen; implications for the pathogenesis of opportunistic vascular tumors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91: 7291-7295.
- 15 Liekens S, Verbeken E, Vandeputte M, et al. A novel animal model for hemangiomas; inhibition of hemangioma development by the angiogenesis inhibitor TNP-470 [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(10): 2376-2383.
- 16 徐钊, 张志愿, 陈万涛. 转基因小鼠血管瘤动物模型建立 [J]. *中华口腔医学杂志*, 2003, 38(5): 355-357.
- 17 刘军, 宋建星, 邢新, 等. 血管内皮细胞生长因子基因移植制备大鼠血管瘤模型 [J]. *第二军医大学学报*, 2005, 26(10): 1124-1127.
- 18 许振起, 王衣祥, 孟娟红, 等. 重组腺相关病毒携带人血管内皮细胞因子 121 制备小鼠血管瘤模型的初步探讨 [J]. *中华口腔医学杂志*, 2009, 44(3): 162-164.
- 19 Kitajima S, Enqi L, Masatoshi M, et al. Transgenic rabbits with increased VEGF expression develop hemangiomas in the liver; a new model for Kasabach-Merritt syndrome [J]. *Lab Invest*, 2005, 85: 1517-1527.
- 20 Riant F, Bergametti F, Aygnac X, et al. Recent insights into cerebral cavernous malformations: The molecular genetics of CCM [J]. *FEBS*. 2010, 277: 1070-1075.
- 21 Whitehead KJ, Plummer NW, Adams JA, et al. Ccm1 is required for arterial morphogenesis; implications for the etiology of human cavernous malformations [J]. *Development (Cambridge, England)* 2004, 131: 1437-1448.
- 22 Boulday G, Blecon A, Petit N, et al. Tissue-specific conditional CCM2 knockout mice establish the essential role of endothelial CCM2 in angiogenesis; implications for human cerebral cavernous malformations [J]. *Disease models & mechanisms*, 2009, 2: 168-177.
- 23 David A. McDonald, Robert Shenkar, Changbin Shi, Rebecca A. Stockton. A novel mouse model of cerebral cavernous malformations based on the two-hit mutation hypothesis recapitulates the human disease [J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(2): 211-222.
- 24 Aguilar G, Diaz SH, Lavernia EJ, et al. Cryogen spray cooling efficiency: Improvement of port wine stain laser therapy through multiple-intermittent cryogen spurts and laser pulses [J]. *Lasers in surgery and medicine*, 2002, 31(1): 27.
- 25 Vlachakis I, Gardikis S, Michailoudi E. Treatment of hemangiomas in children using a Nd:YAG laser in conjunction with ice cooling of the epidermis: techniques and results [J]. *BMC Pediatrics*, 2003, 3: 2.
- 26 白南, 陈远征, 陈石海, 等. 平阳霉素治疗血管瘤的应用与研究 [J]. *中国美容医学杂志*, 2006, 15(2): 198-200.

(上接第 319 页)

- Pulmonary cysts in early childhood and the risk of malignancy [J]. *Pediatr pulmonol*, 2009, 44: 14-30.
- 6 Priest JR, Hill AD, Williams GM, et al. Type I pleuropulmonary blastoma: A report from the international Pleuropulmonary Blastoma registry [J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24: 4492-4498.
- 7 Hill DA, Ivanovich J, Priest JR, et al. Germline DICER1 mutations in familial pleuropulmonary blastoma [J]. *Science*, 2009, 325: 965.
- 8 Boman F, Hill DA, Williams GM, et al. Familial association of pleuropulmonary blastoma with cystic nephroma and other renal tumors: A report from the International Pleuropulmonary Blastoma Registry [J]. *J Pediatr*, 2006, 149: 850-854.
- 9 Priest JR, Willams GM, Hill DA, et al. Pulmonary cysts in early childhood and the risk of malignancy [J]. *Pediatr Pulmonol*, 2009, 44: 14-30.
- 10 Mut P R, Muro V, Nebot C, et al. Pleuropulmonary blastoma in children: imaging findings and clinical patterns [J]. *Radiologia*, 2008, 50(6): 489-494.
- 11 Hill DA, Jarzembowski JA, Priest JR, et al. Type I pleuropulmonary blastoma: pathology and biology study of 51 cases from the international pleuropulmonary blastoma registry [J]. *Surg Pathol*, 2008, 32(2): 282-295.
- 12 Taube JM, Griffin CA, Yonescu R, et al. Pleuropulmonary blastoma: cytogenetic and spectral karyotype analysis [J]. *Pediatr Dev Pathol*, 2006, 9(6): 453-461.
- 13 JM, Griffin CA, Yonescu R, et al. Pleuropulmonary blastoma: cytogenetic and spectral karyotype analysis [J]. *Pediatr Dev Pathol*, 2006, 9(6): 453-461.
- 14 Corap ioglu, Liman T, Aksu G, et al. A case report with type II pleuropulmonary blastoma: successful treatment with surgery and chemotherapy [J]. *Turk J Pediatr*, 2009, 51: 78-81.
- 15 Priest JR, Mc Dermott MB, Bhatia S, et al. Pleuropulmonary blastoma: a clinicopathologic of 50 cases [J]. *Cancer*, 1997, 80: 147-161.
- 16 Ohta Y, Fujishima M, Hasega H, et al. High therapeutic effectiveness of post operative irinotecan chemotherapy in typical case of radiographically and pathologically diagnosed pleuropulmonary blastoma [J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2009, 31: 355-358.