

# 细胞注射法建立裸鼠血管瘤模型的研究进展

陈淑明<sup>1</sup> 陈少全<sup>2</sup> 张再重<sup>2</sup> 谈华敏<sup>2</sup> 郭良<sup>2</sup> 原博<sup>2</sup> 王烈<sup>2</sup>

血管瘤是婴幼儿最常见的血管疾病。目前有口服激素、激光、核素注射及手术治疗,但存在较多不良反应和创伤,近年来口服普萘洛尔的疗效已获得证实,但作用机制仍不明确,建立有效的血管瘤模型成为研究婴幼儿血管瘤发病机制、生物学特性及治疗方案的迫切需要。近年来随着组织培养学及实验动物学的发展,采用细胞注射法建立血管瘤的体外模型成为一种理想方法。现就其研究进展综述如下。

## 一、细胞种类

长期以来婴幼儿血管瘤被认为来源于血管内皮细胞(Endothelial Cells, ECs)<sup>[1]</sup>。其过度增殖是血管瘤组织病理学上的重要形态表现。血管瘤的增殖、消退主要表现为血管瘤内皮细胞与外周细胞的变化,而血管瘤内皮细胞被认为是体现该进程的标志细胞<sup>[2]</sup>。有报道通过在裸鼠皮下注射血管瘤内皮细胞(HemECs)建立血管瘤动物模型,证实原代血管瘤内皮细胞裸鼠皮下注射可以建立可靠的血管瘤模型<sup>[3,4]</sup>。陆阳等<sup>[5]</sup>应用培养的永生化人脐静脉内皮细胞(HUVEC)与可降解材料 Matrigel 混合后注射于裸鼠皮下,移植后可见血管样结构的形成,血管内皮细胞的大量增殖。一定程度上再现了血管瘤增生期内皮细胞增殖的病理过程,提示以人脐静脉内皮细胞构建血管瘤模型的可行性。人外周血管内皮祖细胞(EPCs)是血管内皮细胞的前体细胞,具有很强的扩增分化能力,且其不断分化是加速血管内皮细胞增殖的潜在原因<sup>[6,7]</sup>。此外,EPCs 与血管瘤组织在分子生物学上还具有较为相近的生物学特性<sup>[8,9]</sup>。很适合作为构建血管瘤模型的材料,且通过移植 EPCs 与基质胶混匀后,移植到裸鼠皮下育出了与血管瘤有着许多相似之处的组织,也验证了运用该细胞构建血管瘤模型的可行性<sup>[10,11]</sup>。但无

论是人脐静脉内皮细胞还是人外周血管内皮祖细胞,均表明建立模型的可能性,未得到很好的证实。也有研究报道利用小鼠血管瘤内皮细胞瘤细胞系建立裸鼠血管瘤模型,但所造的模型常伴有血栓形成、DIC 及脾肿大等症状,最终小鼠因各种并发症而死亡,一般用于 Kasabach-Merritt 或致死性血管瘤模型的研究,不利于单纯血管瘤疾病模型的研究。

自 2008 年 Khan 等<sup>[12]</sup>首次报道从婴幼儿血管瘤组织中提取出血管瘤干细胞(HemSCs),将单个细胞克隆后,植入裸鼠体内,7 d 后可形成人类血管,从血管组织提取干细胞,植入第 2 只裸鼠后,能再次形成血管组织。血管瘤干细胞成为一种建立婴幼儿血管瘤模型的理想细胞。这样形成的血管组织能够表达婴幼儿血管瘤的特异免疫诊断标志物葡萄糖转运蛋白 GLUT-1 和层黏连蛋白 Merosin<sup>[13]</sup>;植入 2 个月后,血管数目减少,而脂肪细胞变得明显,证实血管瘤来源细胞在裸鼠体内形成了血管和脂肪细胞。该研究重建了独特的婴幼儿血管瘤演变过程:形成血管,随后转变为脂肪组织。提示干细胞可能是婴幼儿血管瘤的来源细胞。2011 年 Shoshana Greenberger 等<sup>[14]</sup>通过在裸鼠皮下注射 CD133<sup>+</sup> 血管瘤干细胞建立动物模型,证实地塞米松可以抑制血管瘤干细胞中 VEGF-A 的产生,但不能抑制血管瘤内皮细胞 VEGF-A 的产生。Dan Xu 等<sup>[15]</sup>也通过血管瘤干细胞成功建立模型,研究发现,增长期血管瘤培养的 HemSCs 比消退期血管瘤培养的 HemSCs 表达明显增多的 SALL4<sup>+</sup> 和 CD133<sup>+</sup> 细胞。这些研究表明了血管瘤干细胞建立婴幼儿模型的可行性与理想性。

## 二、细胞分离、培养与鉴定

### (二)血管瘤内皮细胞的分离培养与鉴定

血管瘤内皮细胞标本取自于 1 岁以内处于增殖期的草莓状血管瘤,未接受过其它治疗,且家属要求手术的婴幼儿血管瘤患者,以前人们采用机械刮除法<sup>[16]</sup>和通过流式细胞仪及后期免疫磁珠法<sup>[17]</sup>分离出内皮细胞,虽能获得较高纯度的内皮细胞,但存在着价格昂贵,细胞得率不高,细胞损伤较大,操作复

杂,且往往易造成微生物污染,不利于广泛使用等因素。又由于血管瘤内皮细胞增殖缓慢,且贴壁能力差。所以近年来人们在培养过程中使用血管生成因子或肿瘤条件培养基来刺激内皮细胞增殖。且为了利于细胞贴壁,可预先在培养器皿表面铺一层明胶、纤连蛋白或胶原等构成促贴壁基质。随后魏珩等<sup>[18]</sup>采用组织块结合酶消化法培养血管瘤内皮细胞。采用该两种方法培养的血管瘤内皮细胞不但成活率高,细胞纯度高,细胞损伤较小,便于细胞贴壁生长,也避免了因组织消化而混入大量的纤维细胞,并抑制成纤维细胞生长,进一步发现大量血管瘤内皮细胞从组织块边缘长出,细胞形态单一、整齐。近年来又陆续报道了通过 2 次过滤网过滤来获得单细胞悬液<sup>[19,20]</sup>。简单的说就是,血管瘤样本经过 PBS 冲洗、切碎,胶原酶消化后获得的组织匀浆先通过 100 目滤网过滤,并在样品中加入红细胞裂解液。再次将样品通过 40 目滤网过滤,得到单细胞悬液后于完全内皮细胞培养基培养。最后将细胞置于 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中培养,每 2~3 d 换液 1 次。组织块接种后 4~5 d 成纤维细胞过度生长可抑制内皮细胞的生长,经纯化的内皮细胞生长汇合后,用相差倒置显微镜观察,发现细胞呈多角形或鹅卵石样形态,培养 3~4 周呈旋涡式生长。血管瘤内皮细胞的特异性标记物有:VonWillebrand 因子(vWF)及Ⅷ因子相关抗原、CD34、CD31 等<sup>[21]</sup>。第Ⅷ凝血因子相关抗原、CD34 是鉴定血管瘤血管内皮细胞的特异性标记物。因此通常采用 CD34 单克隆抗体和第Ⅷ因子相关抗原(FⅧRAG)鉴定,采用 CD34 免疫荧光染色法对血管瘤血管内皮细胞进行鉴定,结果显示细胞核周围呈现橙色均匀团状的结构。显微镜下观察,第Ⅷ凝血因子相关抗原主要表达于血管瘤内皮细胞的细胞浆,阳性颗粒均呈棕黄色。

## (二) 脐静脉内皮细胞和人外周血管内皮祖细胞分离培养与鉴定

脐静脉内皮细胞采用健康产妇分娩后新鲜脐带经消化酶灌注-反复贴壁纯化法提取,可以获得比较满意的效果。培养的人脐静脉内皮细胞早期呈小多角、球形、呈团状,24 h 后可见细胞贴壁,逐渐生长成梭形,有些呈鱼贯状相连。3~4 d 后达到融合,呈多角形,为单层呈铺路石样排列<sup>[22]</sup>。第Ⅷ因子相关抗原经免疫荧光检测脐静脉内皮细胞,显微镜下胞质中可见大量黄绿色荧光,摄取 ac-LDL 和吸附 UEA-1 的细胞功能,DiI-ac-LDL 红色荧光,

荧光强度高;FITC-UEA-1 绿色荧光,荧光强度高,胞核呈蓝色荧光<sup>[23]</sup>。也可用内皮细胞标志物 CD31 鉴定,染色结果为细胞核内可见橙色颗粒。人外周血管内皮祖细胞标本来自于健康人外周血,经多次稀释、加入人淋巴细胞分离液离心后于 EGM-2 培养基培养隔天换液。CD133<sup>+</sup> 血管内皮祖细胞体外培养形态观察:贴壁小细胞团在 4~5 d 可见伪足伸出,7 d 后呈克隆状迅速生长,2~3 周后密集区细胞呈“鹅卵石”样,培养 4 周后融合小的细胞呈梭形<sup>[24]</sup>。通过免疫组化检测其细胞表面标志 CD133、CD34、VEGFR-2 和Ⅷ因子表达均呈阳性。

## (三) 小鼠血管瘤内皮细胞瘤细胞分离培养与鉴定

小鼠血管瘤内皮细胞瘤细胞系 EOMA 分离自一自发荷瘤的 129/J 小鼠,常规培养于 DMEM 培养基中[含 10% (体积分数) FBS, 100U/ml 青霉素, 100mg/mL 链霉素],置于 37℃ 10% (体积分数) CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中。EOMA 单层培养呈“鹅卵石”样排列、围成管腔样结构。

## (四) 血管瘤干细胞分离培养与鉴定

大量研究发现血管瘤干细胞可能来源于同一原始干细胞,Boye 等<sup>[25]</sup>发现,血管瘤内皮细胞是无性繁殖,并表现出增高的生长和迁移特性。血管瘤干细胞的培养标本来源同血管瘤内皮细胞,标本经 PBS 漂洗后切成小块(1 mm × 1 mm),再次经 PBS 漂洗,经 2% 胶原蛋白 A 消化后,置于 DMEM 培养基(含 2% PBS、1.26 mmolCaCl<sub>2</sub>、0.93 mmolMgCl<sub>2</sub>、100 U/mL 青霉素、100μg/mL 链霉素、0.25 μg/mL 两性霉素 B),37℃ 水浴半小时,所得组织匀浆经 100 目滤网过滤,加入红细胞裂解液,再次将样品通过 40 目滤网过滤,得到单细胞悬液后,用 CD133 免疫磁珠分选出血管瘤干细胞培养于涂有纤维蛋白胶的 EBM-2/20% FBS 培养基,每 2 d 更换一次培养液。所分离的单细胞悬浮液通过免疫组化检测血管瘤干细胞标记物,SALL4、CD133 和 FDR 均阳性表达,且婴幼儿血管瘤的特异免疫诊断标志物葡萄糖转运蛋白 GLUT-1 也呈阳性表达。

## 三、细胞注射法建立模型

刘超等<sup>[4]</sup>将培养的 HemEC 200μl (10<sup>6</sup> cells/mL)接种到 BALB/nu nu 裸鼠腋下,7 d 后可见小米粒样凸起,大小约 1 mm × 1 mm × 1 mm,部分开始形成血管,第 30 天大小约 5 mm × 4 mm × 3 mm,形成大量小血管,第 60 天大小约为 2 mm × 3 mm × 2 mm,部分血管开始萎缩。所建立模型的时间可达

60 d, 为进行药物筛选及药效观察提供充足时间。而陆阳等<sup>[5]</sup>利用 HUVEC 建立的模型, 切取移植 1 周后的组织块, HE 镜下观察 Matrigel 内出现大量管道样结构, 某些管样结构内出现红细胞, 5 周后的组织块, HE 镜下观察可见 Matrigel 内出现大量圆形管样结构, 某些管样结构内出现红细胞, 这使得利用 HUVEC 建立血管瘤模型成为一种可能, 但是尚未得到长期证实。李文志等<sup>[9]</sup>将培养的 EPCs 于 Matrigel 混合注射至裸鼠腹部皮下组织, 1 周后可见凸起的肿块, 2 周后生长迅速, 体积明显增大, 外形呈圆球状, 4 周后生长缓慢, 血管腔大小不一, 部分呈血窦样, 6 周后几乎生长停滞。同 HUVEC 一样, 通过 EPCs 建立的模型目前尚未有很好的证实。Michael 等采用 3~5 周龄同源 129/J 小鼠, 于皮下注射  $5 \times 10^6$  cells/mL 小鼠血管瘤内皮细胞瘤细胞系 EOMA, 2 d 后肿瘤即可出现, 但所造模型常伴有血栓形成、DIC 及脾肿大等症状, 最终小鼠因各种并发症而死亡, 一般用于研究 Kasabach-Merritt 或致死性血管瘤模型的研究, 不利于单纯血管瘤模型的研究。

Khan 等<sup>[10]</sup>将培养的血管干细胞同 Matrigel (一种能支持血小板及血管生成的可溶性基底膜基质) 混合后  $200 \mu\text{l}$  ( $1.5 \times 10^6$  cells/mL) 注射至 nu nu 裸鼠皮下, 第 7 天便可见血管形成, 直到第 56 天仍可观察到血管, 不过更多的是脂肪细胞的填充。然而同等条件下采用相同方法皮下注射 HemECs, 血管瘤内皮祖细胞 HemEPCs, 骨髓间充质干细胞 (BM-MSCs), 脐带血内皮祖细胞 (cbEPCs), 人类新生儿皮肤成纤维细胞 (NHDFs) 分别与 Matrigel 混合后均不能见到血管形成。Xu 等<sup>[13]</sup>将培养的血管干细胞与 Matrigel 混合后  $200 \mu\text{l}$  ( $10^6$  cells/mL) 注射至免疫缺陷的 6 周龄 NOD/SCID 小鼠双侧腋下。观察肿瘤生长, 且所有肿瘤 GLUT-1 表达均阳性, 证实为血管瘤, 通过切取组织切片染色观察: 细胞注射的第 10 天可见大量增殖的内皮细胞, 第 20 天可见血管组织和脂肪组织, 第 30 天大部分细胞已经分化, 肿瘤进入消退期。此模型生长过程的 30 d 周期代表人类婴幼儿血管瘤 5~9 年的演变过程。此外 David M 等<sup>[26]</sup>将培养的 HemECs ( $1.5 \times 10^6$ ) 联合 HemSCs ( $1.5 \times 10^6$ ) 同 Matrigel 混合后,  $200 \mu\text{l}$  注射至 nu nu 裸鼠背部也成功建立了模型, 第 10 天便可见丰富的血管形成。MAI Hua-ming 等<sup>[27]</sup>将 HemSC 混悬于 Matrigel 中植入裸鼠皮下, 注射 1~2 周便可形成微血管。联合脐静脉内皮细胞混悬于 Matrigel 中, 则形成的血管数量显著增加, 新形成的血管均表达血

管瘤特异性标记 Glut-1。而单独注射脐静脉内皮细胞未见血管生成。这些都表明利用血管瘤干细胞建立的血管瘤模型很好的模拟了婴幼儿血管瘤增殖、消退、消退完成期的病理过程, 更适合关于血管瘤疾病的研究, 也是我们今后研究的重点。

总之, 细胞注射法建立裸鼠血管瘤模型技术趋向成熟, 血管瘤干细胞建立的裸鼠血管瘤模型虽然能够很好模拟人类血管瘤增殖、消退、消退完成期的病理过程, 但仍存在所形成的血管瘤组织并没有出现与临床类似的快速增长及有效的药物干预治疗尚未在模型很好运用, 相信随着研究的深入, 我们能够更好研究其发病机制、病理过程, 为血管瘤的治疗提供更有有效的治疗手段。

## 参考文献

- 1 Bauland CG, van Steensel MA, Steijlen PM, et al. The pathogenesis of hemangiomas: a review [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2006, 117(1): 29-35.
- 2 LoK, Mihm M, Fay A. Current theories on the pathogenesis of infantile hemangioma [J]. *Semin Ophthalmol*, 2009, 24(3): 172-177.
- 3 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): 1012-1014.
- 4 刘超, 秦中平, 魏奉才, 等. 细胞注射法和组织块移植法在构建血管瘤动物模型中的比较 [J]. *山东大学学报*, 2012, 50(5): 46-50.
- 5 陆阳, 薛继鑫, 李伟, 等. 利用永生化人脐静脉内皮细胞构建血管瘤模型的初步研究 [J]. *组织工程与重建外科杂志*, 2009, 5(5): 253-255.
- 6 Ingram DA, Mead LE, Moore DB, et al. Vessel wall - derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells [J]. *Blood*, 2005, 105(7): 2783-2786.
- 7 Alev C, Li M, Asahara T. Endothelial progenitor cells: a novel tool for the therapy of ischemic diseases [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(4): 949-965.
- 8 Roach EE, Chakrabarti R, Park NI, et al. Intrinsic regulation of hemangioma involution by platelet-derived growth factor [J]. *Cell Death Dis*, 2012, 21(3): 328-338.
- 9 彭强, 周昉, 刘文英, 等. 血管内皮祖细胞在血管瘤中的表达和作用 [J]. *临床小儿外科杂志*, 2009, 8(5): 18-21.
- 10 李文志, 董勇, 辛毅, 等. 血管内皮祖细胞制备血管瘤动物模型的探索研究 [J]. *中国美容整形外科杂志*, 2012, 23(8): 503-505.
- 11 宋波, 唐学阳, 刘利君, 等. 人类血管瘤模型的研究现状

- [J]. 临床小儿外科杂志, 2013, 12(4): 324-327.
- 12 Khan ZA, Boscolo E, Picard A, et al. Multipotential stem cells recapitulate human infantile hemangioma in immune deficient mice [J]. J Clin Invest, 2008, 118: 2592-2599.
  - 13 North PE, Waner M, Mizeracki A, et al. GLUT1: a newly discovered immunohistochemical marker for juvenile hemangiomas [J]. Hum Pathol, 2000, (1): 11-22.
  - 14 Shoshana Greenberger, Joyce Bischoff. Infantile Hemangioma - Mechanism(s) of Drug Action on a Vascular Tumor [M]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2011: 1-10.
  - 15 Dan Xu, Teresa MO2, Archil Shartava, et al. Isolation, characterization, and in vitro propagation of infantile hemangioma stem cells and an in vivo mouse model [J]. Journal of Hematology & Oncology, 2011, 4: 54.
  - 16 Mulliken JB, Zetter BR, Folkman J. In vitro characteristics of endothelium from hemangiomas and vascular malformations [J]. Surgery, 1982, 92(2): 348-353.
  - 17 马刚, 林晓曦, 金云波, 等. 婴幼儿血管瘤内皮细胞的分离、培养及鉴定 [J]. 中华整形外科杂志, 2008, 24(2): 144-147.
  - 18 魏珩, 俞松, 姜富贵, 等. 蔡洛尔对体外培养的血管瘤内皮细胞凋亡的影响 [J], 实用儿科临床杂志, 2012, 27(11): 821-822.
  - 19 Greenberger S, Boscolo E, Adini, et al. corticosteroid suppression of VEGF - A in infantile hemangioma - derived stem cells [J]. N Engl J Med, 2010, 362(11): 1005-1013.
  - 20 Yi Ji, Siyuan Chen, Kai Li, et al. role of  $\beta$ -adrenergic receptor signaling in the proliferation of hemangioma - derived endothelial cells [J]. Cell Division, 2013, 8(1): 1-11.
  - 21 Dubois NA, Kolpack LC, Wang R, et al. Isolation and characterization of an established endothelial cell line from transgenic mouse hemangiomas [J]. 1991, 196(2): 302-313.
  - 22 张瑛, 邹和群, 夏学颖. 改良酶消化法体外培养人脐静脉内皮细胞 [J]. 山西医科大学学报, 2012, 43(6): 476-479.
  - 23 刘长乐, 郑心田, 李广平. 体外人脐静脉内皮细胞的培养鉴定及抗原表达分析 [J]. 山东医药, 2011, 51(36): 25-26.
  - 24 谢松涛, 陈璧, 陶克. 人脐血中 CD133 + 血管内皮祖细胞的分离培养和生物学特性 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(7): 1287-1290.
  - 25 Boye E, Yu Y, Paranya G, et al. Clonality and altered behavior of endothelial cells from hemangiomas [J]. J Clin Invest, 2001, 107: 745-752.
  - 26 David M. Smadja, John B Mulliken, et al. E - Selectin Mediates Stem Cell Adhesion and Formation of Blood Vessels in a Murine Model of Infantile Hemangioma [J]. The American Journal of Pathology, 2012, 181(6): 2239-2247.
  - 27 MAI Hua-ming, ZHENG Jia-wei, WANG Yan-an, et al. CD133 selected stem cells from proliferating infantile hemangioma and establishment of an in vivo mice model of Hemangioma [J]. Chin Med J, 2013, 126(1): 88-94.

## • 消息 •

### 2014 年南方省(区)小儿外科学术研讨会暨全国小儿外科新技术学习班通知

为加强南方各省(区)的科研合作与交流,促进小儿外科实验研究与临床技术水平的提高。经研究,由中南、西南地区小儿外科学分会主办,湖南省医学会、湖南省医学会儿外科学分会承办,湖南省儿童医院协办的 2014 年南方省(区)小儿外科学术研讨会拟定于 2014 年 5 月在湖南岳阳召开。大会将邀请著名专家作专题讲座,介绍小儿外科各专业医疗技术的最新进展,并在小儿外科基础应用研究及临床新技术等方面进行学术交流。欢迎各位同道踊跃投稿、参会。现将会议有关事宜通知如下:

① 会议时间:2014 年 5 月 23~25 日;② 会议地点:南湖宾馆·岳阳市南湖邕园路 36 号;③ 报到时间:2014 年 5 月 23 日 8:00-22:00;④ 注册费:800 元/人,注册费含会务费,资料费、餐费;⑤ 住宿:会务组将按回执进行安排。单双间统一按 238 元/间/天,费用回单位报销;⑥ 学分证书:凡注册代表均可获得 I 类国家级医学教育学分;⑦ 会务及投稿联系人:殷波 电话:13574867363,湖南省医学会小儿外科专业委员会,湖南省儿童医院, E-mail: yb030303@163.com

湖南省医学会

湖南省医学会儿外科学专业委员会

二〇一四年四月