

蛋白表达并无明显相关性;临床研究中 VEGF 与 MMP-9 表达呈现出的相关性^[2]应尚有其他调节机制。结合各学者的研究结论,我们认为 VEGF 与 MMP 在人舌癌的血管生成及肿瘤浸润转移中的作用受多种因素调节影响。

参考文献

1 Riedel F, Gotte K, Schwalb J, et al. Expression of 92-kDa type IV collagenase correlates with angiogenic markers and poor survival in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2000, 17 (6): 1099-1105.

2 于大海,曹莹,姚志文,等.载体携带小干扰 RNA 抑制 Tca8113 细胞 VEGF 的表达[J]. *华西口腔医学杂志*, 2008, 26 (5): 550-552.

3 Wang L, Zhang LH, Li YL, et al. Expression of MMP-9 and MMP-9 mRNA in gastric carcinoma and its correlation with angiogenesis [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2003, 83 (9): 782-786.

4 Bair EL, Massey CP, Tran NL, et al. Integrin- and cadherin-mediated induction of the matrix metalloprotease matrilysin in cocultures of malignant oral squamous cell carcinoma cells and dermal fibroblasts [J]. *Exp Cell Res*, 2001, 270 (2): 259-267.

5 Hong X, Jiang F, Kalkanis SN, et al. Decrease of endogenous vascular endothelial growth factor may not affect glioma cell proliferation and invasion [J]. *J Exp Ther Oncol*, 2007, 6 (3): 219-229.

6 于大海,曹莹,李敬,等. RNA 干扰沉默血管内皮生长因子抑制人舌癌细胞增殖的实验研究[J]. *广西医科大学学报*, 2008, 25 (3): 329-332.

7 曹莹,于大海,李敬,等. VEGF-siRNA 对人舌癌 Tca8113 细胞体内及体外生长影响的初步研究[J]. *广西医学*, 2008, 30 (5): 617-619.

8 Lalla RV, Boisoineau DS, Spiro JD, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptors on tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2003, 129 (8): 882-888.

[收稿日期 2009-04-27][本文编辑 谭毅 黄晓虹]



人舌癌移植瘤模型中血管内皮细胞来源的实验研究

朱名毅, 姚金光, 黄英华, 蔡捷, 邝晓聪

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30860326),广西自然科学基金资助项目(No. 桂科自 0640202),广西教育厅资助项目[桂教科研(2005)47号]

作者单位:530021 南宁,广西医科大学病理生理学教研室(朱名毅,黄英华,邝晓聪);广西医科大学科学实验中心(蔡捷);533000 百色,右江民族医学院口腔科学教研室(姚金光)

作者简介:朱名毅(1982-),男,在读硕士研究生,研究方向:肿瘤干细胞与肿瘤血管关系

通讯作者:邝晓聪,男,副教授,研究方向:癌干细胞研究。E-mail: bskxc@yahoo.com.cn

[摘要] 目的 观察人舌癌裸鼠皮下移植瘤模型中肿瘤新生血管内皮细胞的来源。方法 通过皮下移植人舌癌 Tca8113-M1 细胞建立人舌癌裸鼠移植肿瘤模型,并于肿瘤生长至直径 1cm 时切除肿瘤,对移植瘤进行病理组织学观察,利用免疫组织化学方法检测移植瘤内新生血管内皮细胞的来源,抗体为鼠抗人单克隆抗体 CD34 和大鼠抗小鼠单克隆抗体 CD34;并进行微血管密度(microvessel density, MVD)计数及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达检测。结果 右腋窝皮下接种人舌癌 Tca8113-M1 细胞 2 周后,6 只裸鼠的肿瘤直径都达到 1 cm 以上,切片 HE 染色可见肿瘤组织病理形态为鳞状上皮细胞癌, MVD 平均值为 10.72 ± 2.12,其中肿瘤新生血管内皮细胞大鼠抗小鼠 CD34 免疫组化结果是阳性,而鼠抗人 CD34 阴性。VEGF 在 6 例移植瘤标本中均阳性表达,平均阳性率为(67 ± 5.6)%。结论 人舌癌移植瘤模型中血管内皮细胞主要来源于宿主裸鼠,并且可能与肿瘤细胞分泌的 VEGF 诱导有关。

[关键词] 舌癌; Tca8113-M1 细胞; 血管生成; 血管内皮细胞

[中图分类号] Q 343 [文献标识码] A [文章编号] 1674-3806(2009)06-0548-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2009.06.02

The origin of vascular endothelial cell in nude mice bearing human tongue carcinoma ZHU Ming - yi, KUANG Xiao - cong, HUANG Ying - hua, et al. Department of Pathophysiology, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To explore the origin of vascular endothelial cells in human tongue carcinoma xenograft model by nude mice. **Methods** The model of human tongue carcinoma xenograft was established by transplanting Tca8113 - M1 subcutaneously to nude mice, to identify the germinal origin of neovascularization and assay the microangiogenesis, the neoplasms (> 1cm in diameter) induced by Tca8113 - M1 were removed and dealt with histopathologically through immunohistochemical staining of VEGF and CD34 (including rat - anti - human and rat - anti - mouse CD34). **Results** HE staining showed squamous cell carcinoma; positive expression was observed in rat - anti - mouse CD34 staining and MVD averaged 10.72 ± 2.12 , meanwhile no visible alteration of rat - anti - human CD34 staining; moreover, VEGF staining presented a 100% positive ration in six transplanted tumor and the numbers of positive cells averaged (67 ± 5.6)% in every slice. **Conclusion** The germinal origin of vascular endothelial cells in Tca8113 - M1 xenograft model derived from host nude mice, and may be induced by VEGF which is secreted by tumor cells.

[Key words] Tongue carcinoma; Tca8113 - M1 cell; Angiogenesis; Vascular endothelial cell

肿瘤血管形成以及抗肿瘤血管治疗是肿瘤学研究领域中的热点,其中对于肿瘤新生血管内皮细胞的来源有多种观点,也各有实验依据,为此我们利用人舌癌永生生化细胞系 Tca8113 - M1 建立了裸鼠移植瘤模型,探讨动物模型中肿瘤血管内皮细胞的来源及其与肿瘤细胞之间的相互作用关系。

1 材料与方 法

1.1 肿瘤细胞来源及培养 人舌癌永生生化细胞(Tca8113 - M1)来自我们自己建立的细胞系。所有细胞按本室常规方法,即用含 10% 新生小牛血清(四季清公司产品)、双抗(含青霉素 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、DMEM 培养基(hyclone 公司),置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 混合气体孵箱中培养,细胞换液时间为 2 d,每 3 ~ 4 d 传代一次,传代前以 0.25% 胰酶(Hyclone 公司)消化至细胞变圆、脱落为止。

1.2 实验动物 6 只 4 ~ 5 周龄雄性 BALB/c - nu 裸鼠购自中科院上海实验动物中心,体重 18 ~ 22 g/只,按 SPF 级无菌室条件分笼饲养,用高压灭菌的饮用水和辐照饲料供动物自由摄取。

1.3 建立裸鼠皮下移植瘤模型 待细胞处于旺盛生长期,细胞形态良好时进行接种。消化收集细胞,以 800 r/min 离心 3 ~ 5 min,弃上清液,计数细胞总量,并以含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液按接种浓度 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 稀释细胞,消毒裸鼠右腋窝皮下,总共接种 6 只。接种后每天观察注射点有无破溃红肿,以皮下结节直径超过 1.0 cm 为成瘤标准。

1.4 观测移植瘤裸鼠体重和肿瘤体积的变化 每隔 5 d 称裸鼠的体重,并测量肿瘤的体积,肿瘤体积(V)按公式计算: $V = \pi/6 L \times W^2$ (L 为长径、W 为横径),单位为厘米(cm)。肿瘤组织用 10% 甲醛固

定,用于病理检测。

1.5 移植瘤组织病理学及免疫组织化学检测

1.5.1 试剂与材料:鼠抗人单克隆抗体 CD34(即用型)、鼠抗人单克隆抗体 VEGF(即用型)、SP 免疫组化试剂盒(即用型)、DAB 显色试剂盒均购自福州迈新生物技术开发有限公司。大鼠抗小鼠单克隆抗体 CD34(浓缩型)购自 Biologend 公司。

1.5.2 CD34 和 VEGF 表达检测:用免疫组织化学 SP 方法检测移植瘤组织中人、鼠来源的 CD34 和 VEGF 表达,移植瘤标本经 10% 中性甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,4 μm 厚切片后,按试剂盒说明书操作步骤进行检测。每批染色均用试剂公司提供的阳性切片作为阳性对照,PBS 代替一抗作为阴性对照,所有切片结果应用 leica 病理图像分析系统采集图像。

1.5.3 染色结果判定及微血管密度的测定:VEGF 染色以胞浆中出现棕黄色颗粒为阳性,每张切片 400 倍光镜下随机选取 5 个视野,计算阳性细胞百分率。CD34 染色以胞浆和细胞膜出现棕黄色颗粒为阳性内皮细胞,凡单个孤立的或多个紧密排列的内皮细胞团,只要与邻近肿瘤细胞及周围结缔组织成分分界清楚,不论有无血管腔,即可计数为 1 个微血管数。在 100 倍光镜视野下扫视整个切片寻找血管高密度集中的区域作为“热点”,然后在 200 倍光镜视野下应用 leica 病理图像分析系统计数微血管数目,各计数 5 个高倍视野,取其平均值作为该标本的微血管数。

2 结果

2.1 移植成瘤生长情况及组织病理学的检测结果 接种肿瘤细胞 5 ~ 7 d 后可于注射部位触及皮下结

节,绿豆大小、表面光滑、质硬、可活动。1周以后可见皮下肿瘤生长迅速,2周后最大直径都达1.0 cm以上(图1),成瘤率100%。在取材前裸鼠的饮食正常,活动因荷瘤受限,未见有体重减少。取材时肿瘤平均重量为(0.51 ± 0.12) g,肿瘤平均体积为(0.31 ± 0.22) cm³。剥离肿瘤标本可见肿瘤包膜完整,与肌肉粘连不明显,有一定活动度,表面可见少量血管增生,肿瘤中心没有坏死、液化。移植瘤 HE 染色(图2)间见细胞成多角形,异型性明显,核浆比例增大,可见瘤巨细胞,核椭圆形、圆形、大小不等,核分裂相多见,并见病理核分裂,肿瘤实质内

可见少量血管,部分血管内可见红细胞(图2 箭头指示),癌细胞排列呈巢状、片状或条索状,未见坏死灶。

2.2 移植瘤血管密度和 VEGF 表达情况

2.2.1 CD34 为细胞膜和细胞浆染色,表达于血管内皮细胞。在同一标本中使用同样的实验方法,200 × 高倍视野下大鼠抗小鼠 CD34 阳性(图3 - A) MVD 平均为 10.72 ± 2.12,而鼠抗人 CD34 未见明显阳性染色(图3 - B)。肿瘤组织内显示的微血管形态不一,结构紊乱,呈椭圆、星状、裂隙状等,在部分明确阳性血管内可见红细胞。

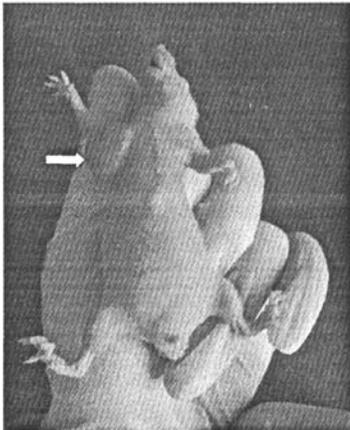


图1 裸鼠人舌癌腋窝皮下移植模型
箭头所示为移植瘤

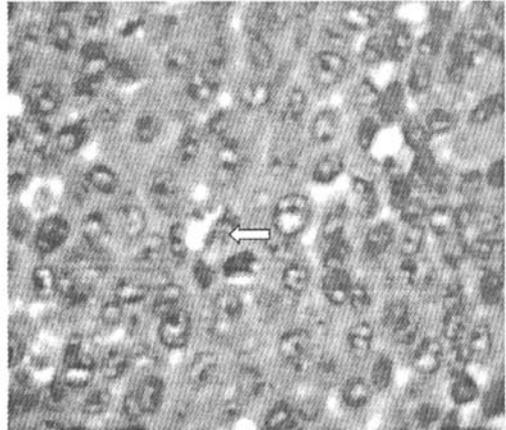


图2 裸鼠人舌癌移植瘤(HE × 400)
箭头所示为血管及红细胞

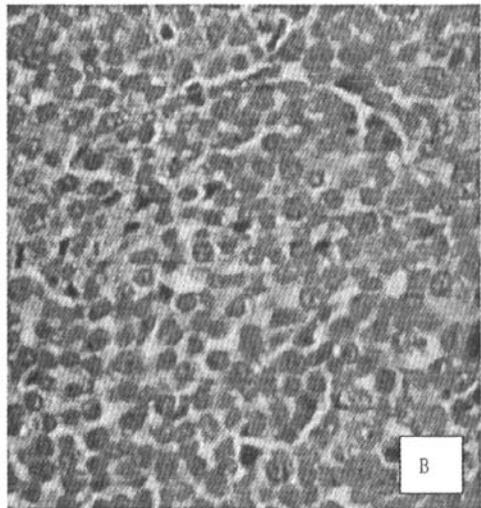
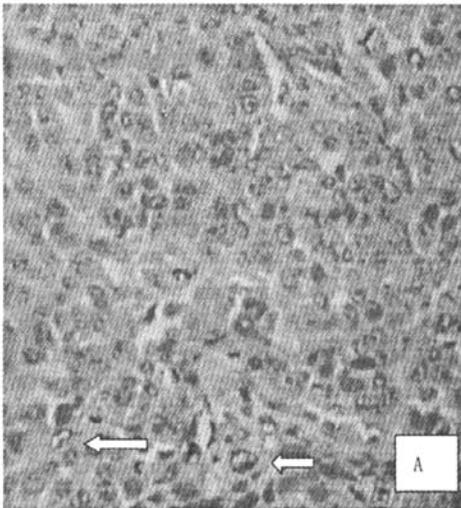


图3 裸鼠人舌癌移植瘤中内皮细胞 CD34 蛋白的表达(×200)
A: 抗鼠 CD34 蛋白阳性表达于胞膜、胞浆,箭头所示为阳性细胞;B: 抗人 CD34 蛋白阴性表达

2.2.2 VEGF 在 6 例移植瘤标本中阳性表达率为 100%, VEGF 阳性细胞百分率为(67.3 ± 5.6)% ,

为细胞质染色,染成黄、棕黄、棕褐色不等,主要表达于细胞浆(图4)。表达大多为弥漫性,也有呈灶

状分布,瘤组织浸润边缘和血管周围的肿瘤细胞往往表达增强或增多。

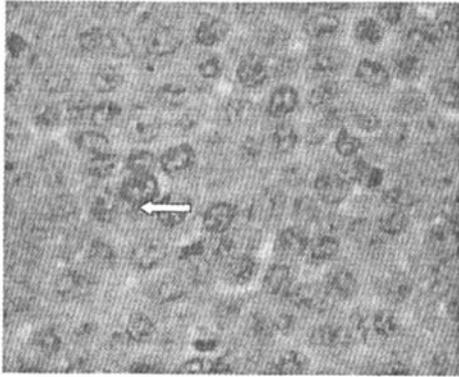


图4 裸鼠人舌癌移植瘤中肿瘤细胞 VEGF 蛋白的表达($\times 400$)

箭头所示为 VEGF 蛋白阳性表达于细胞浆

3 讨论

3.1 血管生成实验模型有很多种,包括体外细胞学模型(内皮细胞增殖实验、内皮细胞迁移实验和小管形成实验等等)和在体模型(角膜微囊实验、鸡胚绒毛尿囊膜实验和肿瘤皮下移植模型等)。而本研究采用裸鼠皮下移植瘤模型,易于观测肿瘤的生长状况,也利于我们检测移植瘤内新生血管的内皮细胞来源。目前研究表明,肿瘤新生血管内皮细胞的来源较多,根据肿瘤血管生成方式而归纳其血管内皮细胞的来源主要有:(1)内皮依赖性血管^[1]:即骨髓源或外周血源的内皮祖细胞通过迁移和分化为内皮细胞,也参与肿瘤血管的形成。(2)血管生成拟态(vasculogenic mimicry)^[2]:即不依赖于内皮细胞的血供方式,肿瘤细胞通过自身变形和细胞外基质重塑直接围成血管样管道,并与宿主血管相连,获取血供。(3)马赛克血管(mosaic vessels)^[3]:即肿瘤细胞和血管内皮细胞相间排列在肿瘤血管壁上,共同围成肿瘤的血管。(4)肿瘤干细胞来源的血管^[4]:即在肿瘤内的肿瘤干细胞在各种促血管生长因子调节下分化为内皮细胞,从而形成肿瘤血管。在我们实验中,移植瘤裸鼠的肿瘤生长比较均一,移植瘤模型组织病理也是鳞状上皮细胞癌,其间可见明显的血管,表明其是舌癌细胞注射到裸鼠皮下形成的肿瘤,生长到一定程度就需要新生血管给肿瘤细胞提供营养和排除代谢产物。

3.2 在本实验研究中,我们根据抗体反应的种属特异性,针对内皮细胞标记物 CD34,选择抗人 CD34 和抗鼠 CD34 两种单克隆抗体,用免疫组织化学的

方法检测同样的舌癌移植瘤。检测的结果发现舌癌移植瘤中抗鼠 CD34 的免疫组化结果是阳性,而抗人 CD34 的则是阴性,也就是说裸鼠移植瘤新生血管内皮细胞的来源是宿主裸鼠。我们的实验结果证实人舌癌裸鼠皮下移植瘤中新生血管是内皮依赖性血管,即血管内壁由裸鼠骨髓或外周血来源的内皮祖细胞分化为成熟内皮细胞衬覆,肿瘤细胞不参与血管壁构成,提示该移植瘤中肿瘤干细胞(人源性细胞)不是移植瘤血管生成的主要来源。我们进一步检测了移植瘤细胞 VEGF 的表达情况,发现移植瘤组织中 VEGF 阳性表达率非常高,表达率为 100%,平均阳性细胞数为(67 ± 5.6)%。VEGF 是最重要的促新生血管形成因子^[5],在人体生理性和病理性血管形成过程均发挥重要作用,并且在各种原癌基因、缺氧或者细胞因子的作用下,肿瘤细胞分泌 VEGF 与内皮细胞上的 VEGF 受体结合,调节肿瘤血管的新生,这提示人源的舌癌细胞可以分泌 VEGF,参与和调控舌癌移植瘤中鼠来源的血管内皮细胞的形成,也说明移植瘤中血管形成微环境可以诱导裸鼠宿主的血管生成前体细胞参与新生血管的形成。因此,本试验建立的人舌癌移植瘤模型可以用于诸如抗血管治疗的动物试验研究。此外,肿瘤新生血管内皮细胞可能来自骨髓或外周血的内皮祖细胞。因此,在选择抗血管的作用靶点时,不仅针对已形成的血管,还要考虑新生的血管内皮细胞,甚至内皮祖细胞作为干预对象,为抗肿瘤血管治疗与研究提供新思路。

参考文献

- Nolan DJ, Ciarrocchi A, Melick AS, et al. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization[J]. *Genes Dev*, 2007, 21(12):1546-1558.
- Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vitro: vasculogenic mimicry[J]. *Am J Pathol*, 1999, 155(3):739-752.
- Chang YS, de Tomaso E, McDonald DM, et al. Mosaic blood vessels in tumors; frequency of cancer cells in contact with flowing blood[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(26):14608-14613.
- Busolati B, Bruno S, Grange C, et al. Identification of a tumor-initiating stem cell population in human renal carcinomas[J]. *FASEB J*, 2008, 22(10):3696-3705.
- Kerbel RS. Tumor Angiogenesis[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(19):2039-2049.

[收稿日期 2009-03-25][本文编辑 韦挥德 黄晓红]