

Analysis and Comparison of Biological Characteristics of Tumor Related Endothelial Progenitor Cells

Kun Yan^{1*}, Wei Cheng², Xin Xu³, Zhiliang Wang², Jie Li¹, Zongzheng Ji¹, Yiming Li¹, Tao Wu¹, Gang Cao¹, Yanxia Duan¹

¹Department of General Surgery, The Second Affiliated Hospital of Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an Shaanxi

²The Department of Respiratory Internal Medicine, Xi'an Children Hospital, Xi'an Shaanxi
Email: *topestyk@163.com

Received: Mar. 28th, 2018; accepted: Apr. 20th, 2018; published: Apr. 27th, 2018

Abstract

Objective: Our study aims to assess the difference of endothelial progenitor cells (EPC) between normal controls and liver cancer patients, and to explore the sources, distribution, tube formation ability and biomarker of EPC. **Methods:** The mononuclear cells were separated by density gradient centrifugation bind with immune magnetic beads. They could develop into the endothelial cells with conditions medium stimulate regeneration. Flow cytometer technology detected the surface antigen changes of all process. **Results:** The mononuclear cells could induce to develop into the EPC. There is no difference between the liver cancer patients and normal controls in bone marrow and peripheral blood. But the endothelial progenitor cells from the spleen are obviously increased in the liver cancer patients. **Conclusion:** The mononuclear cells, which derived from bone marrow and distributed in all organization, could develop into EPC and the endothelial cells. The biological characters of progenitor cells reduced gradually during this process. The microenvironment of spleen in liver cancer patients are the favorable to the differentiation of mononuclear cells.

Keywords

Angiogenesis, Endothelial Progenitor Cells, Biological Characteristics, Liver Cancer, Spleen

肿瘤相关内皮祖细胞生物学性状分析、比较

闫堃^{1*}, 程玮², 徐心¹, 王志亮¹, 李杰¹, 纪宗正¹, 黎一鸣¹, 吴涛¹, 曹罡¹, 段艳霞¹

¹西安交通大学医学院第二附属医院普通外科, 陕西 西安

*通讯作者。

文章引用: 闫堃, 程玮, 徐心, 王志亮, 李杰, 纪宗正, 黎一鸣, 吴涛, 曹罡, 段艳霞. 肿瘤相关内皮祖细胞生物学性状分析、比较[J]. 临床医学进展, 2018, 8(2): 247-252. DOI: 10.12677/acm.2018.82042

²西安市儿童医院呼吸内科, 陕西 西安
Email: topestryk@163.com

收稿日期: 2018年3月28日; 录用日期: 2018年4月20日; 发布日期: 2018年4月27日

摘要

目的: 以正常人为对照探讨内皮祖细胞在肝癌患者中组织学分布的差异性、分析其表面标志物表达情况、细胞形态变化、增殖和管形成能力改变。方法: 密度梯度离心、免疫磁珠贯序分离获取单个核细胞, 用条件分化培养基进行分化刺激培养, 直到分化成熟为内皮细胞。流式检测其生物标志物变化情况。分化潜能, 倍增能力, 功能状况。结果: 单个核细胞经条件诱导培养可定向分化为内皮祖细胞, 表现出部分血管内皮的功能特征。肝癌患者骨髓、外周血与正常人无差异, 脾内内皮祖细胞系分化明显增强。结论: 来源于骨髓单个核细胞分布于多个组织中, 可定向分化为内皮祖细胞, 进而成熟为内皮细胞, 此过程干/祖细胞的生物学特征逐渐降低直至消失。肝癌患者脾脏为此过程提供了最佳的分化诱导内环境。

关键词

血管生成, 内皮祖细胞, 生物学性状, 肝癌, 脾脏

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

从组织胚胎学角度, 内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)生长发育的起源头于胚胎期的多能干细胞及骨髓内多能造血干细胞。在特定的条件下, 如胚胎发育等生理过程和炎症、肿瘤等病理过程, 其受信号传导调节后释放进入循环, 在外周组织中特定的微环境内增殖、分化后定向归巢参与血管新生。内皮祖细胞的发现改变了早期认为 Angiogenesis [1]的芽生方式是成熟个体血管形成的唯一形式。1971年美国哈佛大学医学院 Judah Folkman 教授据此提出了肿瘤相关血管理论[2] [3], 当时认为 Vasculogenesis 即内皮祖细胞仅参与个体发育早期阶段的, 但最近研究却发现, EPCs 在冠心病、哮喘等血管重构性疾病及肿瘤、组织损伤再生都发挥着重要的作用[4]。内皮祖细胞的标志、分类、分化的信号通路尚未统一, 我们对人源 EPCs 进行分离比对, 初步观察不同组织来源的 EPCs 的生物学表形差异。

2. 材料和方法

2.1. 材料

20 份外周血(取自 15 份肝癌患者及 5 份正常查体志愿者), 10 份骨髓标本(取自 3 份肝癌患者及 7 份正常志愿者), 5 份脾脏标本(1 份肝癌患者及 4 份外伤脾破裂患者), 6 份脐带血及 12 份脐带(取自健康足月顺产或剖宫产的新生儿)。M-199 培养液, 无血清生长因子复合物, Ab-CD34(小鼠源), 同型 IgG (Abnova), SP 免疫组化试剂, DAB 显色试剂盒 (福州迈新); 磁珠分离套装盒(NEB), 倒置光学显微镜; 37℃ 孵箱 (Forma Scientific); Coulter 流式细胞仪(Beckman); 留取外周静脉: 留取 20 mL 新鲜外周血, 5% 肝素抗凝。

采集后 2 h 内进行分离。胎盘娩出后脐血立即于 CPDA 抗凝的采血袋内保存。脐带血采集后在无菌条件下离心(4℃ 800 r/min × 10 min), 接种于含 2%LSGS(低血清补充物)的 M199 培养基, 静置于 37℃ 5% CO₂ 孵箱中培养 4~12 h。从髂后上棘留取骨髓, 收集于肝素抗凝剂的 10 mL 离心管中。采集后 2 h 内进行分离。本研究经西安交通大学第二附属医院伦理委员会批准并经患者知情同意。

外伤脾脏破裂急诊手术取脾后, 立刻取新鲜脾脏组织, 研磨后以 Percoll 液(1.082 g/L)重悬, 4℃ 离心(2 000 r/min × 20 min)。离心后留取中间云雾层细胞, 用 M-199 接种培养。

2.2. 方法

2.2.1. 细胞分离培养

首先, 应用密度梯度离心获得单个核细胞后采用免疫磁珠分选 CD133+细胞(具体操作依据 NEB 磁珠分选试剂盒略作修改), 获得的细胞重悬于无血清含细胞生长因子复合物的 M-199 培养基中, 以 $1 \times 10^6/\text{cm}^3$ 接种于 T25 培养瓶(均预先用 $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Fibronectin 于 37℃ 包被 3 h)中, 静置 48 小时后隔日半量更换无血清培养液, 计为 P0 代细胞, 计算平均贴壁细胞数。每 3 日计数集落数。达 70%~80%时传代, 以 $(1\sim 5) \times 10^3/\text{cm}^2$ 接种培养。

2.2.2. 细胞鉴定

隔日不同放大倍数下倒置显微镜观察细胞, 记录形态特征。对数生长期细胞传代后消化离心, 调整细胞密度为 $1 \times 10^7/\text{L}$, PBS 重悬。每份细胞悬液取 200 μL , 分别加入荧光标记的 CD34、CD133、CD31、VEGFR2 和 CD14 单抗各 20 μL , 4℃ 避光共孵育 3 小时, PBS 洗涤 2 次后测定, 流式复测 3 次取均值。

2.2.3. 细胞增殖、分化潜能测定

分离获得的 EPC 编号并记录来源信息后, 自 P0 代 EPC 开始至细胞生长至 80%开始传代, 直至细胞衰老。细胞计数, 绘制时间 - 细胞增殖曲线。

每组设复孔 5 个, 分别于传代后 24 h、48 h、72 h 测定细胞的增殖情况: 按照 MTT 试验的常规方法加入 MTT 溶液, 继续培养 4 h, 弃上清, 再加入 DMSO, 振荡 10 min 使结晶充分溶解, 在光密度测定仪上 490 nm 处测 OD 值。以均数 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示。

EPC 稳定传代后, 消化离心并计数。计算消化率 = (该时间被消化下的细胞数/该培养单元的细胞总数) \times 100%, 做出消化率 - 时间曲线, 以此间接反映细胞粘附力的变化;

2.2.4. 管形成能力测定

0℃ 条件下, Matrigel 包被 96 孔板, 37℃ 凝固, 30 min 后接种 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 对数生长期的细胞, 每孔 100 μl , 约 5000 个细胞, 于 37℃、5% CO₂ 绝对静置 48 h。

3. 结果

3.1. EPC 分离、鉴定

采用磁珠吸附及梯度离心贯序分离获得的 EPC 立刻接种, 绝对静置 6~12 h 开始贴壁, 细胞极性不显著, 呈团状聚集, 多边形, 24 h 后铺路石交错排列, 单层贴壁生长、核质分解清晰, 胞核呈类圆形。48 h 铺满整个瓶皿后传代培养, 内皮细胞在 2~3 h 后逐渐贴壁, 呈多角形、长多角形或梭形, 细胞间相互连接, 较第一代细胞生长旺盛, 肝癌患者脾分离的 EPC 可见多核及巨细胞(见图 1)。可正常传 7~8 代, 此后, 细胞增殖力下降、数目减少、逐渐变性变形, 呈条索状或网格状, 不能形成单层、不能继续传代培养。

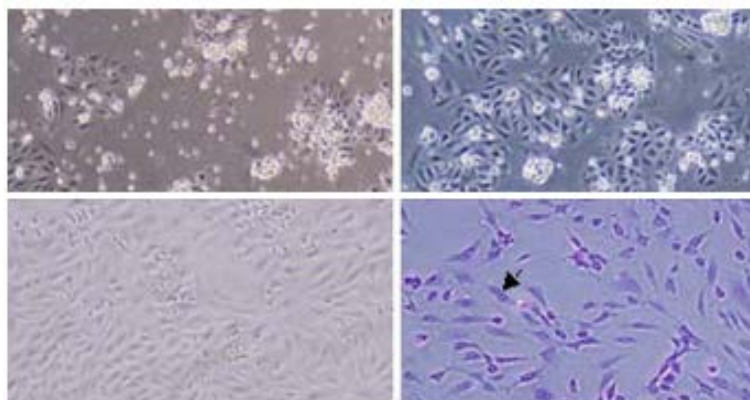


Figure 1. The morphology of EPC $\times 100$

图 1. EPC 体外培养细胞形态 $\times 100$

健康人群骨髓、脐血、脾脏、外周血所获得的 EPC 数量之比约为 15:10:10:1, 这与陆士新教授的结果相似[5]。肝癌患者骨髓、脾脏、外周血之比为 5:4:1, 健康人与肝癌患者骨髓所获得 EPC 大致相同, 我们未观察到单一的肝癌患者出现骨髓动员的现象。

EPCs 生物表型变化随代次增加, 干/祖细胞的表面标志物数量急剧降低, 功能标志物增高, 但无明显组间差异。分化表型标志物 CD133, CD31, VEGFR2 至第 10 代达到平台期。

EPCs 增殖潜能的变化接种成功的 EPC, 经短暂的休眠期后, 即进入对数增殖阶段体外培养约每 72 h 可传一代, 第 4~6 代达增殖峰期, 第 9~10 代急剧下降, 细胞呈纤维细胞样改变, 传代难以成活。

3.2. 管形成实验

在 Matrigel 中 EPC 初始形成类圆形结构, 后逐渐伸展呈梭状, 接着形成管状结构内皮性结构。倒置显微镜下观察, 可见种植于 Matrigel 中的培养细胞逐渐延伸变长、首尾相接、呈树枝状或网状, 形成典型的管状结构(见图 2)。这就证实了 EPC 具有分化成熟为功能性内皮细胞的特性。

4. 讨论

目前的研究认为, 成熟个体血管形成主要有两种形式, 即血管发生(vasculogenesis)和血管生成(angiogenesis)。传统认为 vasculogenesis 不依赖于已有的成熟的脉管系统, 由干细胞增殖分化而来, 经塑形、管化、再通等过程形成血管, 多见于胚胎早期阶段[6]。而 angiogenesis 以芽生方式来源于已有的成熟的血管系统, 一度被认为是成体血管形成的主要形式。血管发生是一种普遍存在的生理、病理现象, 可见于生命的各个阶段, 如外伤修复, 月经周期子宫内膜功能性改变, 肿瘤等病理生理过程[7]。

单个核细胞的体外成功分离见于 30 年前, 体外分离获得 EPC 可分为早期和晚期克隆。Asahara [8] [9] 1997 年首先使用免疫磁珠方法从人的外周血单个核细胞中培养分离出血管内皮标记物 CD34(+)EPC。给予粒细胞-集落刺激因子(G-CSF)刺激下, CD34(+)EPC 随即分化, 呈现管内皮特征[10]。伴随细胞归巢过程, 趋化迁移受体表达的上调, 细胞呈现明显定向分化表现。我们分离的 CD34(+)EPC 细胞, 随着诱导培养代次增加, VEGFR-2(+)表达上调, 此外还表达 SDF-1、CXCR4、钙粘连素、选择素等内皮生物特异性标志物, 并通过旁分泌或自分泌形式在上述因子作用下发生归巢现象。Harraz [11]等认为 CD14(+)也为 EPC 特异性表面标志物之一, 但我们实验在不同代次细胞间未发现其发生明显特异性变化, 这可能与 EPC 这一异质性较强的细胞不同细胞亚群有关。

内皮祖细胞根据其增殖分化潜能不同有两种主要类型的, 即早内皮祖细胞和晚内皮祖细胞[12], 其中,



Figure 2. The tube formation ability test in Matrigel $\times 100$
图 2. Matrigel 胶管形成试验 $\times 100$

前者是分化早期的,增殖能力较强的细胞,其特异性表型为 CD34+ VEGFR2+ CD133+,后者分化中后期,接近功能细胞的群体,标志物为 CD34+ VEGFR2+CD133-。

此外, Yoder 等[13]研究表明,单个核细胞仍具有多分化潜能,例如某些单个核细胞可经诱导分化为单核-巨噬细胞系,因而不能将单个核细胞等同于 EPC。

脾脏是重要的髓外造血器官,传统上认为出生后,其造血功能逐渐退化。演变为一个周围免疫器官。李宗芳教授[14]经过多年的研究发现脾脏有着独特的血液循环方式,其微环境在血细胞的分化、成熟、归巢中起着重要的作用。同时,还发现脾脏在肝癌的病演变中呈现双向调节性,其具体机制尚未探明。单个核细胞的分化微环境的变动可使分化方向由单核-巨噬细胞系方向转为内皮细胞系方向,这极有可能是一个重要的“Switch”。

1971 年 Judah Folkman 教授[15]提出肿瘤血管靶向治疗理论后,开创了肿瘤靶向治疗的新纪元,建立了肿瘤治疗的新策略。相继有 GX1、DKK1 等多肽为代表的肿瘤血管靶向标志物得到研发。我们也曾参与胃癌血管靶标 GX1 的筛选。Bevacizumab (Avastin)是首个被 FDA 批准使用于临床的肿瘤血管靶向药物,但经一段时间的应用,发现 Bevacizumab 并不能获得理论上的疗效,患者的生存期仅能延长数月,死亡率无改善,并且很快出现理论无法解释的耐药问题。这也使 Bevacizumab (Avastin)成为目前唯一一个被 FDA 批准使用于临床的肿瘤血管[16]靶向药物。因此,我们从新审视肿瘤血管形成理论,显然 angiogenesis 不是肿瘤血管形成的唯一方式。Vasculogenesis 被视为完善肿瘤血管形成机制的重要组成部分, EPC 作为 vasculogenesis 的中心环节,对整个通路的研究起着重要的作用。我们分离获得 EPC 一方面旨在为肿瘤相关血管理论奠定试验基础,同时希望我们的研究能够丰富这一理论,使其重焕光彩。

基金项目

本实验接受陕西省科学技术研究发展计划项目资助(项目编号: 2011K13-03-11)。

参考文献

- [1] Bilusic, M. and Wong, Y.N. (2014) Anti-Angiogenesis in Prostate Cancer: Knocked Down but Not Out. *Asian Journal of Andrology*, **16**, 372-377. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.125903>

- [2] Bielenberg, D.R. and Zetter, B.R. (2015) The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis. *Cancer Journal*, **21**, 267-273. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000138>
- [3] Bertz, S., et al. (2014) Increased Angiogenesis and FGFR Protein Expression Indicate a Favourable Prognosis in Bladder Cancer. *Virchows Arch*, **465**, 687-695. <https://doi.org/10.1007/s00428-014-1672-9>
- [4] Berretta, M., et al. (2016) Angiogenesis Inhibitors for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Frontiers in Pharmacology*, **7**, 428. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00428>
- [5] Yu, P., et al. (2016) Progesterone Modulates Endothelial Progenitor Cell (EPC) Viability through the CXCL12/CXCR4/PI3K/Akt Signalling Pathway. *Cell Proliferation*, **49**, 48-57. <https://doi.org/10.1111/cpr.12231>
- [6] Baharara, J., et al. (2014) Anti-Angiogenesis Effect of Biogenic Silver Nanoparticles Synthesized Using *Saliva officinalis* on Chick Chorioalantoic Membrane (CAM). *Molecules*, **19**, 13498-13508. <https://doi.org/10.3390/molecules190913498>
- [7] Salajegheh, A. (2016) Angiogenesis in Health, Diseases and Malignancy. Springer International Publishing Switzerland. *Anticancer Research*, **36**, 3226. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27272869>
- [8] Ziebart, T., et al. (2016) Significance of Endothelial Progenitor Cells (EPC) for Tumorigenesis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC): Possible Marker of Tumor Progression and Neovascularization? *Clinical Oral Investigations*, **20**, 2293-2300. <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1785-4>
- [9] Falay, M. and Aktas, S. (2016) Endothelial Progenitor Cells (EPC) Count by Multicolor Flow Cytometry in Healthy Individuals and Diabetes Mellitus (DM) Patients. *Clinical Laboratory*, **62**, 2161-2166. <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2016.160402>
- [10] Paynter, R., et al. (2017) Commentary on EPC Methods: An Exploration of the Use of Text-Mining Software in Systematic Reviews. *Journal of Clinical Epidemiology*, **84**, 33-36. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2016.11.019>
- [11] Altabas, V., Altabas, K. and Kirigin, L. (2016) Endothelial Progenitor Cells (EPCs) in Ageing and Age-Related Diseases: How Currently Available Treatment Modalities Affect EPC Biology, Atherosclerosis, and Cardiovascular Outcomes. *Mechanisms of Ageing and Development*, **159**, 49-62. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.02.009>
- [12] Wojakowski, W., et al. (2013) Circulating Endothelial Progenitor Cells Are Inversely Correlated with In-Stent Restenosis in Patients with Non-ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndromes Treated with EPC-Capture Stents (JACK-EPC Trial). *Minerva Cardioangiologica*, **61**, 301-311.
- [13] Povsic, T.J., et al. (2013) EPC Mobilization after Erythropoietin Treatment in Acute ST-Elevation Myocardial Infarction: the REVEAL EPC Substudy. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, **36**, 375-383. <https://doi.org/10.1007/s11239-013-0944-6>
- [14] Yongxiang, W., et al. (2002) Effects of Splenomegaly and Splenic Macrophage Activity in Hypersplenism Due to Cirrhosis. *The American Journal of Medicine*, **113**, 428-431. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(02\)01210-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(02)01210-X)
- [15] Folkman, J., et al. (1971) Isolation of a Tumor Factor Responsible for Angiogenesis. *Journal of Experimental Medicine*, **133**, 275-288. <https://doi.org/10.1084/jem.133.2.275>
- [16] Robinson, K.A., et al. (2016) Twelve Recommendations for Integrating Existing Systematic Reviews into New Reviews: EPC Guidance. *Journal of Clinical Epidemiology*, **70**, 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2015.05.035>

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2161-8712, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: acm@hanspub.org