

肺腺癌 A 549 绿色荧光裸鼠模型中 肿瘤血管内皮细胞来源初探

方 天¹, 胡若愚², 胡文娟¹, 刘 彪¹, 尤金炜¹, 恽时锋¹

(1. 南京军区南京总医院比较医学科, 南京 210002; 2. 东南大学附属中大医院胸心外科, 南京 210002)

【摘要】 目的 建立绿色荧光裸小鼠皮下接种肺腺癌 A 549 模型, 研究肺腺癌肿瘤血管生成过程中血管内皮细胞的来源。**方法** 建立肺腺癌 A 549 皮下接种 GFP 裸小鼠模型, 应用免疫荧光染色法进行 CD 31 染色, 标记肿瘤血管; 采用荧光显微镜观察并拍摄肿瘤组织冰冻切片; 免疫组化检测肿瘤组织血管中内皮细胞内 GFP 表达。**结果** 免疫荧光实验结果显示: GFP 蛋白和 CD 31 蛋白可共表达于部分间质血管; 部分血管表达 CD 31 蛋白而不表达 GFP 蛋白。免疫组化实验结果: 肿瘤组织中部分间质细胞的细胞质和内皮细胞的细胞质表达 GFP 蛋白。**结论** 组成肿瘤新生血管的内皮细胞部分来源于裸鼠体内, 部分来源于肿瘤细胞。

【关键词】 肺腺癌 A 549; 血管生成; 内皮细胞; 肿瘤干细胞

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 03-0046-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2016. 03. 010

Research on the source of endothelial cells in tumor vessels by A 549 tumor model with GFP nude mouse

FANG Tian¹, HU Ruo-yu², HU Wen-juan¹, LIU Biao¹, YOU Jin-Wei¹, YUN Shi-feng¹

(1. Department of Comparative Medicine, National Science Education Base, Nanjing 210002, China,

2. Department of thoracic surgery, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210002, China)

【Abstract】 Objective To explore the source of endothelial cells in tumor vessels by A 549 tumor model with GFP nude mouse. **Methods** To establish the A 549 lung cancer models with GFP nude mice, expression of CD 31 was determined by immunofluorescence to label tumor vessels; to observe and take a picture of the tumor frozen section by confocal microscopy and invert microscope; expression of GFP in tumor vessels was determined by immunohistochemistry. **Result** The results of immunofluorescence showed: Tumor interstitial vascular endothelial cells or endothelial cells clusters and micro-vascular lumen size and shape are clearly visible by immunofluorescence, and part of vessels with no obvious lumen or irregular lumen. We can see green fluorescent in tumor cells of tumor tissue and endothelial cells which form of tumor vessels. The results of immunohistochemistry showed: expression of GFP was determined in cytoplasm of tumor stromal cells and endothelial cells in tumor vessels. **Conclusion** The endothelial cells which formed tumor neovessels that derived from GFP nude mice partly and the other part derived from tumor cells.

【Key words】 A 549; Vascularization; Endothelial cells; Carcinoma stem cells

[作者简介] 方天(1984 -), 女, 硕士, 南京军区南京总医院比较医学科技师, Email: Fangtianlove@126.com。

[通讯作者] 恽时锋(1965 -), 男, 博士, 主任技师, 教授, 研究生导师, 从事医学实验动物学工作, Email: yunshifeng1@163.com。

肿瘤的生成、转移与肿瘤新的血管生成关系密切,肿瘤血管生成一直是人们认识肿瘤生长进程和进行肿瘤治疗的一个重要途径^[1]。近年来,血管靶向药物对于肿瘤治疗有一定疗效^[2],但抗肿瘤血管靶向药物耐药或者疗效不佳(20%~37%)^[3]。最近研究发现,肿瘤内发生染色体变异的内皮细胞是由肿瘤干细胞分化而来,这可能是肿瘤血管生成的另一种重要方式^[4]。肿瘤干细胞的异质性,可塑性导致其功能的多样性,它通过各种方式为肿瘤提供全面的生长所需营养及其他条件^[5-6]。在肺腺癌的研究中,肿瘤干细胞与宿主裸鼠体细胞到底谁是肿瘤血管的主要来源是认识肺腺癌血管新生的重要课题。本实验将对此作初步探索,找出组成肿瘤新生血管的内皮细胞的来源,从而为肺腺癌肿瘤血管治疗提供新的治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 实验动物和主要试剂

实验动物采用 SPF 级 5~6 周龄绿色荧光(GFP)裸小鼠 12 只,雄性。GFP 裸小鼠由本科室选育【SCXK(军) 2012-0047】;实验室【SYXK(军) 2012-0014】。主要试剂和仪器:肺腺癌 A 549 来自本院肿瘤科馈赠。胎牛血清、RPMI-1640 培养液和 0.25% 胰蛋白酶均购自 GIBCO 公司。CD 31 多克隆抗体(Abcam 公司),山羊抗兔 CY3(谷歌生物);GFP 抗体,即 ANTI-EGFP,(博奥森公司);DAPI(谷歌生物);抗荧光淬灭封片剂(谷歌生物)。组化试剂盒 DAB 显色剂(DAKO 公司);病理切片机(上海徕卡仪器有限公司);倒置荧光显微镜(日本尼康公司)。

1.2 肺腺癌 A 549 皮下接种 GFP 裸小鼠模型的制备

GFP 裸小鼠是将 GFP 基因导入 BALB/c-nu/nu 小鼠而得。具体培育过程:通过(GFP) C57BL/6 转基因小鼠与 BALB/c 裸小鼠进行杂交,获得子一代(F1),选取 F1 代小鼠进行自交,产生子二代(F2)代,从 F2 代中选择带绿色荧光的雄性裸小鼠与雌性荧光杂合子,进行全同胞交配,获得的荧光裸小鼠再与 BALB/c 小鼠进行回交,回交后代再自交,产生子三代(F3),F3 代回交后代再自交,产生子四代(F4),如此重复,直至十五代(F15),便可成功选育出在体内能稳定表达 GFP 的绿色荧光裸小鼠。

肺腺癌 A 549 细胞株培养在完全培养基中

(1640 培养液 + 10% 胎牛血清, pH 7.2),置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱内,每天更换培养液,细胞培养至 80%~90% 融合率,0.25% 胰蛋白酶消化传代。接种于生长状况良好的 5~6 周龄 GFP 裸小鼠,共 10 只。待移植肿瘤直径 1~2 cm 时,无痛处死荷瘤 GFP 裸小鼠,取移植肿瘤块放置福尔马林浸泡待用。

1.3 免疫荧光检测内皮细胞表明蛋白的表达

从荷瘤 GFP 裸小鼠体内,在无菌条件下取肿瘤组织块,4% 多聚甲醛浸泡 24 h,30% 蔗糖脱水 48 h, OCT 包埋保存于 -80℃,制作冷冻切片。按照常规荧光免疫步骤检测肿瘤组织块中内皮细胞的分子标记物 CD31 的表达情况,简要如下:4℃ 丙酮固定 15 min, PBS 液漂洗,山羊血清封闭,倾去,勿洗。滴加兔抗鼠多克隆抗体 CD 31(1:50)到切片上,4℃ 孵育过夜;PBS 充分漂洗后加入 CY3 山羊抗兔 IgG(1:300),37℃ 孵育, PBS 漂洗;DAPI 复染细胞核;抗荧光淬灭封片剂封片,荧光显微镜下观察 CD 31 和 GFP 蛋白表达情况。

1.4 免疫组化检测肿瘤组织中 GFP 蛋白的表达

制作冰冻切片步骤同上。常规免疫组化检测肿瘤组织中 GFP 蛋白的表达,简要步骤:抗原修复,血清封闭;滴加 ANTI-EGFP(1:200),切片平放于湿盒内 4℃ 孵育过夜。滴加 HRP(1:200)山羊抗兔的 IgG 覆盖于组织上。DAB 显色;复染细胞核;脱水封片,中性树脂封片。倒置显微镜镜检,图像采集分析。

2 结果

2.1 免疫荧光检测结果

从肿瘤组织切片免疫荧光染色结果看出:血管标记物 CD 31 多克隆抗体免疫荧光染色标记肺腺癌 A549 皮下接种肿瘤组织,DAPI 染核(图 1A、D、G),倒置荧光显微镜观察结果:内皮细胞分子标记物 CD31 蛋白在肺腺癌肿瘤间质血管有强烈的阳性表达,显示 CY3 红色荧光信号,红色荧光信号显示出肿瘤组织间质的血管内皮细胞或者内皮细胞簇包裹形成微血管管腔,并且管腔大小以及形态均清晰可见,但还有部分红色荧光信号显示无明显管腔形态或管腔不规则(图 1B、E、H)。而 GFP 蛋白则显示 GFP 绿色荧光信号,即肿瘤组织中部分肿瘤间质细胞和部分围成血管的内皮细胞有绿色荧光(图 1C、F、I)。进一步采用荧光显微镜观察未进行 CD 31

染色的肿瘤组织冰冻切片,肿瘤组织中 GFP 表达得出同样结论:有部分血管管腔中的内皮细胞表达 GFP,而大部分血管管腔中内皮细胞不表达 GFP(图 2)。肿瘤组织块间质血管侧面剖面免疫荧光染色结果显示:CD 31 有强烈的阳性染色,血管管腔显示

CY3 红色荧光信号(图 3B),而显示出的 GFP 绿色荧光信号则相对很弱(图 3C),这表示组成肿瘤组织间质血管的内皮细胞只有一部分表达 GFP,且表达 GFP 的内皮细胞来源于肿瘤宿主动物即 GFP 裸小鼠。

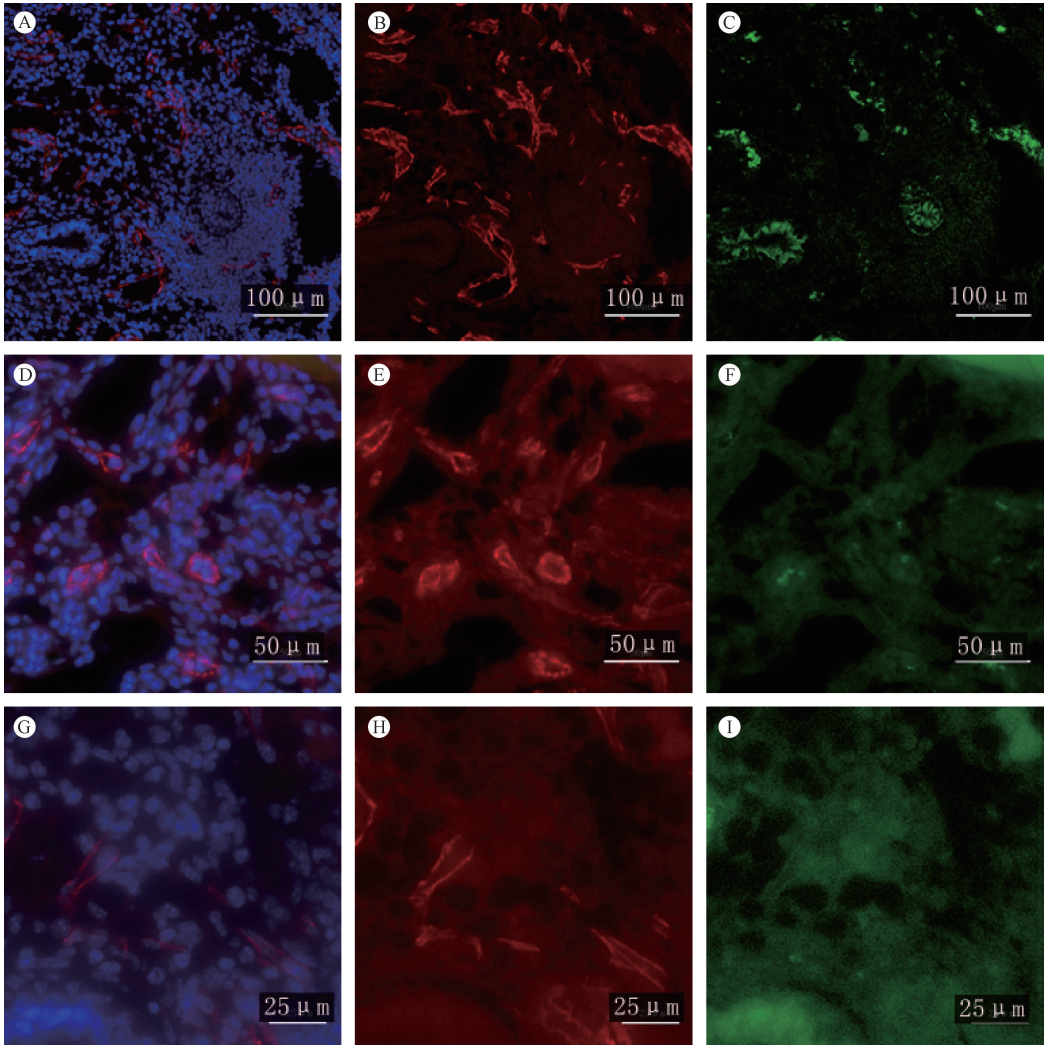


图 1 CD 31 蛋白和 GFP 蛋白在肿瘤组织中的表达
注:A、D、G 为 DAPI(蓝色荧光信号) + CD 31 蛋白标记(红色);B、E、H 为 CD 31 蛋白单标(红色);
C、F、I 为 GFP 蛋白表达(绿色)。

Fig.1 Expression of CD 31 and GFP on tumor frozen section

A、D、G Labeled with CD 31 + DAPI; B、E、H Labeled with CD 31; C、F、I Expression of GFP.

2.2 免疫组化检测结果

由 GFP 单克隆抗体免疫组织化学染色结果表明,肿瘤组织中部分肿瘤细胞的细胞质和组成肿瘤血管的内皮细胞的细胞质表达绿色荧光蛋白(即 GFP,图 3 D、E、F),这一结果与免疫荧光实验中荧光显微镜下观察到肿瘤组织冰冻切片发出 GFP 绿色信号荧光的结果一致(图 1 C、F、I;图 2B、D;图 3C),这表明肿瘤组织冰冻切片中肿瘤间质及间质

血管管腔均有 GFP 蛋白表达,即免疫荧光实验中所发出的绿色荧光由绿色荧光蛋白发出的特异性绿色荧光。这一结果说明,荧光裸鼠体内正常成体细胞在特定条件下定向分化为内皮祖细胞或内皮细胞参与肿瘤组织中的血管新生。

3 讨论

血管生成是肿瘤生长、侵袭、转移和复发的基

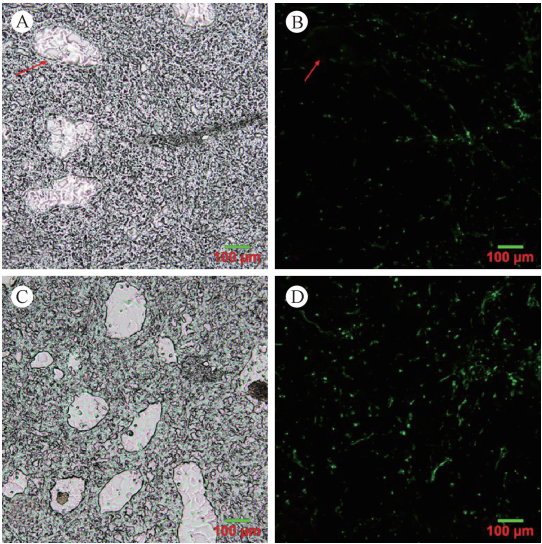


图 2 肿瘤组织冰冻切片中 GFP 表达

Fig. 2 Expression of GFP on tumor frozen section

础^[7]。当肿瘤体积增长大于一定大小时,在没有新生血管长入的条件下,肿瘤组织大多保持静止状态或者退化^[8]。新生血管长入肿瘤组织以后血液供应丰富,这是因为新生血管为肿瘤组织提供足够的营养、氧气和大量的生长因子,从而促使肿瘤迅速

生长。同时,血管生成也与肿瘤转移有着密切的关系,肿瘤新生血管不成熟,肿瘤细胞更加容易穿透微血管壁发生转移;肿瘤新生血管形成后,淋巴回流增加,肿瘤细胞通过淋巴管系统转移,也是促使肿瘤转移的重要影响因素^[9]。经典的血管生成是指由内皮细胞排列围成内皮依赖性血管,即血管壁由分化成熟的内皮细胞(endothelial cells, EC)存覆,该理论认为肿瘤细胞不参与血管壁的构成,此种生成方式一般包括出芽式血管生成、套入式血管生成^[10]。而 Maniotis 等^[11]对此有相反的观点,通过对人眼葡萄膜黑色素瘤进行深入的研究,Maniotis 等首先明确提出肿瘤细胞自身也能形成血管管道从而为肿瘤提供血供。另外,意大利国家卫生所的研究者们发现相同基因组改变的胶质瘤细胞样本中肿瘤衍生血管细胞的数值约为 20% ~ 90%,它们之间存在明显的差异^[12],这表明其中很大一部分组成肿瘤血管的内皮细胞是肿瘤来源的。因此,我们想在肺腺癌的研究中,首先找出组成肿瘤新生血管的内皮细胞的来源,从而阻断新的血管生成、毁坏现有的血管从根本上让肿瘤挨饿不能吸取营养和相关生长因子,达到抑制癌症的发展和转移的目的。

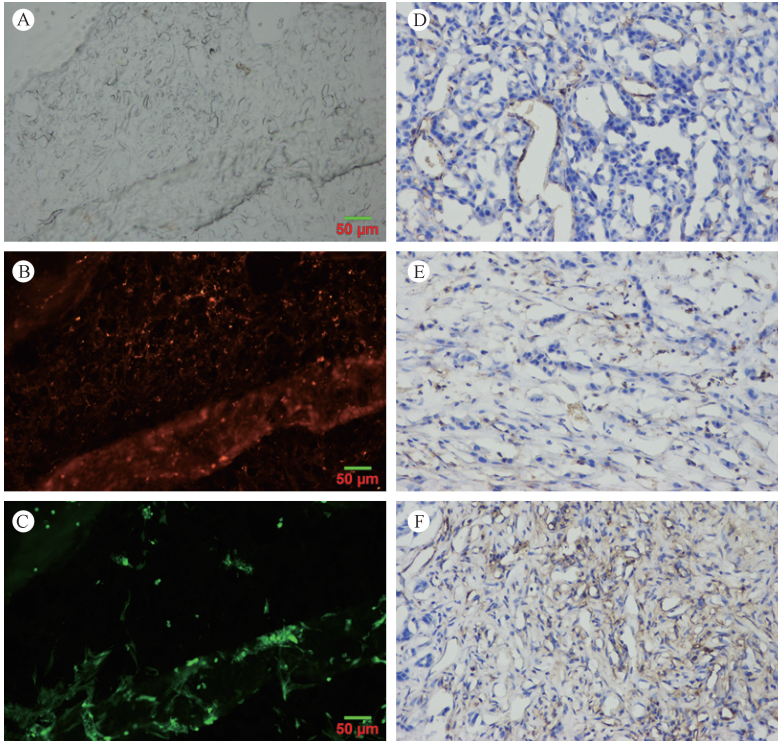


图 3 A、B、C 肿瘤组织冰冻切片中 CD31 和 GFP 的表达;
D、E、F 免疫组化染色检测肿瘤组织冰冻切片 GFP 蛋白的表达(×20)

Fig. 3 A、B、C Expression of CD 31 and GFP on tumor frozen section;
D、E、F Expression of GFP in tumor frozen section was detected by immunohistochemistry

为了研究肺腺癌肿瘤组织中内皮细胞的来源,本研究利用本实验室选育的绿色荧光(GFP)裸鼠建立肺腺癌细胞 A549 皮下接种模型,取完整肿瘤组织块制作冰冻切片,再利用肿瘤血管标志物 CD31 多克隆抗体对肺腺癌 A549 皮下接种肿瘤组织冰冻切片进行免疫荧光染色标记,结合荧光显微拍摄,观察并拍摄 CD 31 和 GFP 在肿瘤血管中的表达情况。本实验室科研人员于 2005 年从美国 Jackson 实验室引进表达 GFP 的 C57BL/6-Tg (ACTB-EGFP) 10sb/J 小鼠,与普通 BALB/c 裸小鼠进行杂交繁育,选育出 GFP 裸小鼠。利用 GFP 裸小鼠具有 T 细胞功能缺陷和系统表达 GFP 的双重特点,跟踪正常体细胞和/或肿瘤细胞在体内的走向及发展,结合现代分子影像学技术,研究癌细胞以及宿主动物之间的关系。在荧光显微镜下,本实验室培育的 GFP 裸小鼠大部分器官都表达绿色荧光,包括心脏、肺脏、脾脏、胰腺、食管、胃和十二指肠,其中皮肤、血细胞、肌肉也表达绿色荧光;该 GFP 转基因裸小鼠既保留了裸小鼠的生物学特性,在全身组织器官中又能稳定表达 GFP。本实验即是利用其血管内皮细胞(EC)表达强烈信号的绿色荧光蛋白,使其肿瘤组织内的血管在荧光显微镜下清晰可见,结合内皮细胞标记物 CD31 标记 GFP 裸小鼠肺腺癌模型肿瘤血管来研究肺腺癌组成新生肿瘤血管的内皮细胞来源。实验结果显示:内皮细胞分子标记物 CD31 蛋白在肺腺癌肿瘤间质血管有强烈的阳性表达,显示 CY3 红色荧光信号,红色荧光信号显示出肿瘤组织间质的血管内皮细胞或者内皮细胞簇包裹形成微血管腔,并且微血管腔大小以及形态均清晰可见,但部分红色荧光信号显示无明显管腔或管腔不规则。而 GFP 表达结果则显示出肿瘤组织中部分肿瘤细胞和部分围成血管的内皮细胞有绿色荧光,即表达绿色荧光蛋白,进一步由 GFP 但克隆抗体免疫组织化学染色结果证实,肿瘤组织在免疫荧光实验中所观察到的绿色荧光信号确实特异性的,是由绿色荧光蛋白发出的。这一结果说明,荧光裸鼠体内正常成体细胞在特定条件下定向分化为内皮祖细胞或内皮细胞参与肿瘤组织中的血管新生。而有部分血管管腔中内皮细胞不表达 GFP,则说明部分组成血管的内皮细胞来自肿瘤细胞 A549 细胞,这些细胞内不表达 GFP,这一结果有力的支持了肿瘤干细胞有可能向血管内皮细胞方向分化的理论,其机制需要进一步深入研究。

随着肿瘤研究的不断深入,目前肿瘤生物学的研究中最具有吸引力的是肿瘤干细胞 (carcinoma stem cells, CSCs) 的理论,该理论认为肿瘤具有自我更新、分化潜能和侵袭能力等方面的诱导性和可逆性。成体细胞的可塑性是生物体内普遍存在的现象,现已发现多种成体干细胞在特定条件下可定向分化为内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPC) 或内皮细胞 (EC) 参与血管新生。Shen 等^[13]的研究提示在某些条件的诱导下,肿瘤干细胞有可能向血管内皮细胞方向分化,其机制可能是通过改变局部微环境(如上皮间质转化),以有利于后续血管新生^[14]。Yao 等^[15]认为肿瘤微环境决定了肿瘤干细胞的可塑性,从而使肿瘤细胞模仿血管管道的而形成血管生成拟态 (vasculogenic mimicry, VM)。肿瘤的维持、生长和转移依赖于血管生成,血管生成成为靶点的治疗方法是近年来生物医学研究中重要的领域^[16-17]。据报道,目前血管内皮生长因子 (VEGF) 是已知最强的促血管生成因子^[18],多种肿瘤研究已经证实阻断 VEGF 信号通路能够降低肿瘤组织中的微血管密度,从而达到抑制肿瘤的生长目的^[19]。临床上抗 VEGF 治疗方法主要是通过联合化疗或者放疗发挥抗癌作用^[20]。由于不同类型的肿瘤抗 VEGF 疗效不一,抗 VEGF 治疗法经常发生耐药^[21-23],这或许与 Dll4-Notch 信号通路有关^[24]。联合采用 DBZ 或者 DAPT (γ-分泌酶抑制剂) 阻断 Notch 信号,或许能够提高 VEGF 抑制剂的疗效,并与之产生抗肿瘤协同效应。本文作者拟在此篇论文研究结论,即肿瘤干细胞有可能向功能性血管内皮细胞方向分化的理论基础上,进一步在机制上阐明 VEGF 抑制剂和 γ-分泌酶抑制剂等如何阻断血管生成因子通路,从而阻止肿瘤血管的生成。

参考文献:

- [1] Goh PP, Sze DM, Roufogalis BD. Molecular and cellular regulators of cancer angiogenesis[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2007, 7: 743 - 758.
- [2] Kos M, Dabrowski A. Tumours angiogenesis - the function of VEGF and BFGF in colorectal cancer[J]. Ann Univ Mariae Curie Sklodowsk, 2002, 57: 556 - 561.
- [3] Rodriguez FJ, Orr BA, Ligon KL, *et al.* Neoplastic cells are a rare component in human glioblastoma microvasculature [J]. Oncotarget, 2012, 3: 98 - 106.
- [4] Butler JM, Kobayashi H, Rafii S. Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors[J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10: 138 - 146.

- [5] Nagy JA, Chang SH, Shih SC, *et al.* Heterogeneity of the tumor vasculature[J]. *Semin Thromb Hemost*, 2010, 36: 321–331.
- [6] Carmeliet P, Jain RK. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic disease[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10: 417–427.
- [7] Ferrara N, Gerber H P, Couter J. The biology of VEGF and its receptors[J]. *Nat Med*, 2003, 9 (6): 669–676.
- [8] Nesbit M. Abrogation of tumor vasculature using gene therapy [J]. *Cancer metastasis Rev*, 2000, 19 (1/2): 45–49.
- [9] Weis SM, Cheresh DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets[J]. *Nat MED*, 2011, 17(11): 1359–1730.
- [10] Liu J, Huang J, Yao WY, *et al.* the origins of vascularization in tumors[J]. *Front Biosci*, 2012, 17 (1): 2559–2565.
- [11] Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, *et al.* Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry[J]. *Am J Pathol*, 1999, 155(3): 739–752.
- [12] Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, *et al.* Tumor vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells[J]. *Nature*, 2010, 468(7325): 824–828.
- [13] Shen R, Ye Y, Chen L, *et al.* Precancerous stem cells can serve as tumor vasculogenic progenitor[J]. *Plos One*, 2008, 3(2): 641–652.
- [14] Krohn A, Song YH, Muehlberg F, *et al.* CXCR4 receptor positive spheroid forming cell are responsible for tumor invasion in vitro[J]. *Cancer Lett*, 2009, 280(1): 65–71.
- [15] Yao XH, Ping YF. Contribution of cancer stem cells to tumor vasculo-genic mimicry [J]. *Protein cell*, 2011, 2(4): 266–272.
- [16] Rosca EV, Koskimaki JE, Rivera CG, *et al.* Anti-angiogenic peptides for cancer therapeutics [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2011, 12(8): 1101–1116.
- [17] Goel S, Duda DG, Xu L, *et al.* Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases[J]. *Cancer Lett*, 2011, 91 (3): 1071–1121.
- [18] Shojaei F. Anti-angiogenic in cancer : Current challenges and future perspectives [J]. *Cancer Lett*, 2012, 320 (2): 130–137.
- [19] Sitohy B, Nagy JA, Dvorak HF. Anti-VEGF/VEGFR therapy for cancer : Reassessing the target[J]. *Cancer Res*, 2012, 72 (8): 1909–1914.
- [20] Goel S, Wong AH, Jain RK. Vascular normalization as a therapeutic strategy for malignant and nonmalignant disease[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2 (3): 1–23.
- [21] Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2008, 8(8): 592–603.
- [22] Kerbel RS. Molecular origins of cancer ; tumor angiogenic[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358, (19): 2039–2049.
- [23] Kieran MW, Kalluri R, Cho YJ. The VEGF pathway in cancer and disease : responses, resistance, and path forward[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2 (12): 1–17.
- [24] Liu SK, Bham SA, Fokas E, *et al.* Delta-like ligand 4-notch blockade and tumor radiation response[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2011, 103 (23): 1778–1798.

〔修回日期〕2016–01–13