

骨髓间充质干细胞对肝癌模型大鼠血管形成的影响**

宋浩¹, 纪卫政², 郇沁文¹, 单骄宇³, 张金辉¹

Effects of bone marrow mesenchymal stem cells on vascularization of hepatoma models of rats

Song Hao¹, Ji Wei-zheng², Tai Qin-wen¹, Shan Jiao-yu³, Zhang Jin-hui¹

Abstract

BACKGROUND: There are few reports about the effects of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) transplantation on vascularization during hepatocarcinogenesis in rats.

OBJECTIVE: To observe the effects of BMSCs transplantation on vascularization during hepatocarcinogenesis in rats.

METHODS: Thirty Wistar rats were divided into BMSCs transplantation group, pure model group and blank control group randomly. The first two groups were treated with diethylnitrosamine to prepare hepatoma models. The blank control group was treated with water as control.

RESULTS AND CONCLUSION: Eight rats in the pure model group and nine rats in the BMSCs transplantation group were proved to be with liver cancer, and the SrY⁺ cells were seen in the BMSCs transplantation group. MRI showed that there were more space-occupying lesions in the liver of the BMSCs transplantation group compared with the pure model group ($t = 2.45, P = 0.026$). The average positive expression rate of vascular endothelial growth factor and microvessel density in the BMSCs transplantation group were higher than those in the pure model group ($P < 0.05$). In the hepatoma models of rats prepared with diethylnitrosamine, BMSCs can promote the vascularization resulting in the development of liver cancer.

Song H, Ji WZ, Tai QW, Shan JY, Zhang JH. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells on vascularization of hepatoma models of rats. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(14): 2481-2486. [http://www.crtor.cn http://cn.zglckf.com]

摘要

背景: 骨髓间充质干细胞移植影响大鼠肝脏癌变过程中肝脏血管报道目前不多。

目的: 观察骨髓间充质干细胞移植对大鼠肝脏癌变过程中血管生成的影响。

方法: 将 30 只 Wistar 大鼠随机摸球法均分成骨髓间充质干细胞移植组、单纯造模组和空白对照组, 前 2 组以二乙基亚硝胺为诱癌剂制备肝癌模型, 空白对照组仅给予正常食水作对照。

结果与结论: 单纯造模组 8 只大鼠形成肝癌, 骨髓间充质干细胞移植组 9 只大鼠形成肝癌, 肝脏携带 SrY 的阳性细胞, MRI 影像中可见较多占位性病变, 而单纯造模组占位病变数量明显较少, 两组比较差异有显著性意义($t=2.45, P=0.026$); 骨髓间充质干细胞移植组大鼠血管内皮细胞生长因子和微血管密度平均阳性表达率均高于单纯造模组($P < 0.05$)。说明在二乙基亚硝胺制备的大鼠肝癌模型中, 骨髓间充质干细胞可通过促进血管的生成而促进肝癌的生长。

关键词: 血管形成; 骨髓间充质干细胞; 大鼠; 肝癌; 血管; 移植

缩略语注释: BMSCs: bone marrow mesenchymal stem cells, 骨髓间充质干细胞; VEGF: vascular endothelial cell growth factor, 血管内皮细胞生长因子

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.14.003

宋浩, 纪卫政, 郇沁文, 单骄宇, 张金辉. 骨髓间充质干细胞对肝癌模型大鼠血管形成的影响[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(14):2481-2486. [http://www.crtor.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

肿瘤起源于干细胞正在各种人类肿瘤中得到证实, 肿瘤不单是一种基因病, 而且还是一种干细胞病。基因突变作用于干细胞, 干细胞突变成肿瘤干细胞, 这是肿瘤发生、再生、转移和复发的关键^[1]。恶性肿瘤的生长具有明显的血管生成依赖性, 新生血管是肿瘤快速生长的物质和形态学基础。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是指存在于骨髓基质内的非造血细胞来源的细胞亚群, 它们可以在体外扩增^[2]。由于间充质干细胞具有自我更新和多向分化潜能的成体干细胞, 具有很强的可塑性, 在生理和病理的情况下, 可能被“征募”

到循环中参与多种组织的再生。本实验通过二乙基亚硝胺造成雌性大鼠肝癌模型, 来了解 BMSCs 对肝癌血管形成的影响。

1 材料和方法

设计: 动物实验观察。

时间及地点: 于 2010-05/2011-04 在新疆医科大学第一附属医院科技实验楼完成。

材料:

实验动物: 健康清洁级 Wistar 大鼠 30 只, 雌雄不限, 体质量 160~200 g, 用于造模研究, 由新疆医科大学动物实验中心提供, 许可证号: A-20100408003, 实验过程中对动物的处置符合医学伦理学标准。雄性大鼠骨髓 P3 代间充质干

¹Department of Endoscopy of Liver Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China;
²Department of Interventional Radiology, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China;
³Department of Parasitology, Basic Medical School, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Song Hao★, Studying for master's degree, Department of Endoscopy of Liver Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. songhao.amos2009@163.com

Corresponding author: Zhang Jin-hui, Chief physician, Professor, Master's supervisor, Department of Endoscopy of Liver Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. zhangjinhui2001@yahoo.com

Supported by: Science Foundation of the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, No. 2009GX02*

Received: 2011-08-30
Accepted: 2011-09-23

新疆医科大学第一附属医院, 肝胆胰腔镜外科, 介入放射科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054; 新疆医科大学基础医学院人体寄生虫学教研室, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

宋浩★, 男, 1985年生, 汉族, 内蒙古自治区大兴安岭市人, 新疆医科大学在读硕士, 主要从事肝胆外科疾病方面的研究。songhao.amos2009@163.com

通讯作者: 张金辉, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 新疆医科大学第一附属医院肝胆胰腔镜外科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054 zhangjinhui2001@yahoo.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2012)14-02481-06

收稿日期: 2011-08-30
修回日期: 2011-09-23
(20110730005/D·L)

细胞, 由新疆医科大学干细胞实验室提供。

主要仪器及试剂:

仪器及试剂	来源
二乙基亚硝胺	上海瑞齐生物科技有限公司
微血管密度抗体、血管内皮细胞生长因子抗体	北京中杉金桥生物公司
步法检测试剂盒 PV-9001, PV-9002、DAB 显色试剂盒	北京中杉金桥生物公司
SrY ISH 原位杂交检测试剂盒	武汉博士德生物公司
GF-SIGNA-HDXT-3.0T 磁共振机、GZX-9070MBE 数显鼓风干燥箱	上海博讯实业 有限公司
LEICA RM2135 切片机、LEICA HI1210 摊片机、LEICA DM3000 采图显微镜系统	德国 Leica 公司
OLYMPUS CH20 显微镜 (DAB 显色用)	日本东京 OLYMPUS 公司
EYELA SLI-700 隔水式恒温培养箱	上海爱朗仪器有限公司

方法:

BMSCs的分离培养、纯化扩增: 采用全骨髓贴壁培养法获取BMSCs。具体操作如下: 取雄性大鼠, 采用10%水合氯醛按3 mL/kg腹腔注射麻醉后颈椎脱臼处死大鼠, 无菌收集双侧股骨及胫骨, 将其浸泡在0.2%青链霉素的PBS-A溶液中15 min后取出, PBS-A冲洗2次, 使用无菌的持针器和咬骨钳将股骨、胫骨两端的骨髓咬除, 使用配置好的L-DMEM液(配置方法为100 mL LG-DMEM 培养基中加入1 000 μ L L-谷氨酰胺、1 000 μ L 0.2 mol/L HEPES缓冲液、1 000 U青链霉素, 并经7.5% NaHCO₃调整pH在7.0), 反复冲洗骨髓腔, 冲洗的骨髓细胞悬液经7#注射器针头吹打4遍、4.5#注射器针头吹打2遍后, 从混匀的骨髓细胞悬液中取出50 μ L左右, 锥虫蓝染色, 滴加在细胞计数板上, 在LEICA正置显微镜下计数, 调整细胞浓度在(6~8) $\times 10^9$ L⁻¹, 加入体积分数10%优级胎牛血清, 接种在100 cm²塑料培养瓶里, 此时接种的细胞称之为原代细胞(简称为P0), 置于体积分数为5%的CO₂饱和湿度、37 °C下孵箱内培养, 48 h后首次换液, 弃去未贴壁的细胞后继续培养, 以后每两三天进行1/3~1/2量换液1次。不断观察细胞形态变化, 待细胞80%~90%融合时加入1.25 g/L胰酶消化, 显微镜下观察细胞变圆时, 生长液终止, 轻摇培养瓶细胞绝大部分脱落, 离心获得第1代细胞(简称为P1), 按1.0 $\times 10^7$ L⁻¹浓度接种传代、逐日观察, 两三天换液, 同法传至第3代(简称为P3), 收获细胞, 在1 500 r/min离心8 min离心4遍, 弃去细胞培养液, 用生理

盐水制成细胞悬液, 最后用200目滤网过滤死细胞或者成团细胞, 锥虫蓝染色、计算拒染率(拒染率=拒染细胞数/细胞总数)评价细胞活力, 细胞活力在95%~97%、调整细胞浓度为2 $\times 10^9$ L⁻¹, 置于4 °C冰箱内保存备用。

BMSCs的鉴定: 将经多聚赖氨酸特殊处理后的玻片置入6孔培养板内, 用含体积分数为10%胎牛血清的L-DMEM培养液(即细胞生长液)冲洗3~5遍, 然后将收获的第2代细胞(简称为P2)以稍高浓度(1 $\times 10^8$ L⁻¹)滴加在玻片上, 4~6 h后在追加细胞生长液, 每两三天进行细胞换液, 大约1周玻片上的细胞融合率可达到70%。细胞苏木精-伊红染色: 取出玻片, 体积分数为95%乙醇固定20 min, 蒸馏水冲洗3遍, 苏木精染液染色7 min, 自来水冲洗, 盐酸乙醇分化, 自来水返蓝后, 伊红染液染色6 min, 自来水冲洗, 取出中性树胶封固^[3]。

大鼠肝癌模型的制备: 将二乙基亚硝胺溶于生理盐水中, 配成0.01%浓度的二乙基亚硝胺饮水, 供BMSCs移植组、单纯造模组供全组大鼠自由饮用造成肝癌模型, 共饮14周, 至14周时更换正常饮水, 空白对照组不造模, 用于对照观察。

实验动物分组及干预: 将30只大鼠随机摸球法均分成BMSCs移植组、单纯造模组和空白对照组。实验采用BMSCs移植组造模过程分别在第4, 8, 12周时经尾静脉注射1 $\times 10^6$ 个P3代BMSCs, 单纯造模组经尾静脉注射等量生理盐水作为对照。造模21周后行MRI检查, 检查肝脏损伤情况, 并对比3组大鼠肝脏差异, 再将大鼠麻醉后颈椎脱臼处死, 取出肝脏组织, 观察大鼠肝脏形态, 比较3组大鼠区别; 做苏木精-伊红染色, 观察大鼠肝脏病理组织变化; SrY原位杂交实验, 用于检测雄性大鼠BMSCs移植于BMSCs移植组大鼠是否成功, 若有阳性表达提示BMSCs移植成功; 再用免疫组化SABC法检测VEGF及CD34的表达。所有指标实验过程均参考SABC试剂盒说明书, 4种指标均用1:100的比例稀释。

判断标准: 血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial cell growth factor, VEGF)阳性判定标准参照文献[4]。主要在细胞浆和细胞膜表达, 阳性细胞呈棕黄色或棕褐色颗粒, 高倍镜下($\times 400$)对每张切片随机选取5个视野, 每个视野计数200个细胞, 共计1 000个, 计算阳性细胞的百分数。微血管密度的测定参照相关文献的方法^[5]: ①微血管密度阳性以血管内皮细胞胞

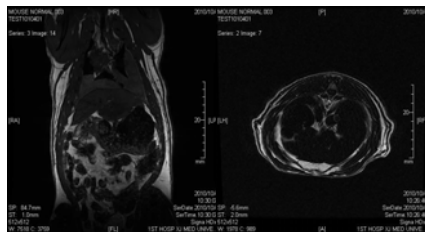
质内出现棕黄色颗粒状染色为标准。②微血管计数以被染成棕黄色的单个内皮细胞或内皮细胞簇作为1个血管计数。只要结构不相连,其分支结构也计作一个血管计数(肌层较厚以及管腔面积大于8个红细胞直径的不计数)。③先在低倍($\times 40$)下观察切片,选择微血管分布最高密度区;然后在高倍($\times 200$)计数5个视野的微血管数,取其平均值为该例的微血管密度值,分辨不清或染色模糊的细胞不计入结果。

主要观察指标:通过BMSCs移植观察其对大鼠肝癌形成过程中肝脏血管生成的影响

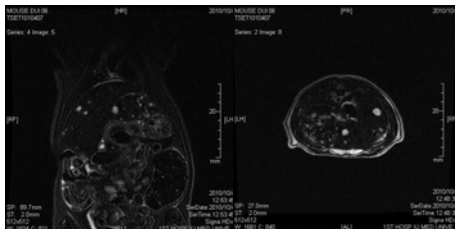
统计学分析:应用SPSS 17.0软件进行统计分析,统计数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,根据实验资料的性质和数据类型采用 t 检验和方差分析,相关性检验用Spearman等级相关分析。

2 结果

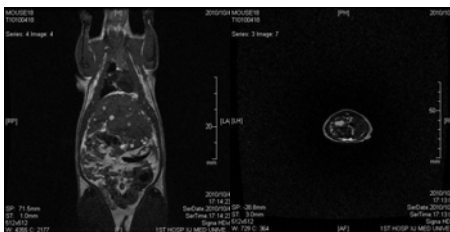
2.1 大鼠肝脏癌变过程中的MRI变化 见图1。



a: The blank control group, normal liver size, no signal performance



b: The pure model group, a number of space-occupying lesions in different sizes were seen at T1WI of rat liver



c: The bone marrow mesenchymal stem cells transplantation group, more space-occupying lesions of different sizes were seen at T1WI of liver compared with the pure molding group

Figure 1 MRI changes of the liver during hepatocarcinogenesis of rats in each group

图1 各组大鼠肝脏癌变过程中MRI变化

空白对照组大鼠肝脏未见异常信号表现; BMSCs移植组和单纯造模组大鼠T1WI大多数病变以稍低信号

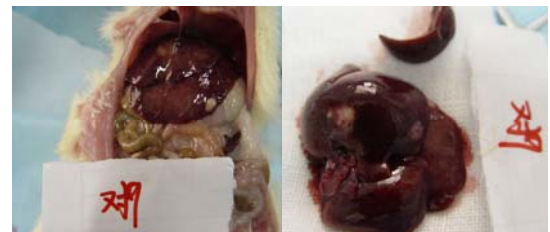
为主, T2WI大多数病变以高信号为主, 考虑为肿瘤可能大; 部分病灶T1WI和T2WI表现为等信号, 考虑为肿瘤出血可能; 少部分病灶T1WI为高信号, T2WI为等信号, 考虑为脂肪变性或囊肿; BMSCs移植组占位性病变平均为 (6.50 ± 3.69) 个, 单纯造模组占位性病变平均为 (2.89 ± 2.71) 个, 两组占位性病变数量上比较, 差异有显著性意义($t = 2.45$, $P = 0.026$)。

2.2 大鼠造模成功数量及造模过程一般情况 空白对照组大鼠在21周时一般生活状态良好饮食、活动未见异常; 单纯造模组和BMSCs移植组大鼠精神萎靡, 较少活动, 饮食、饮水均较空白对照组减少, 单纯造模组共有8只形成肝癌, 且有1只大鼠死亡, 3组大鼠存活率为96.7%; 经病理判断单纯造模组大鼠是因中毒严重而致大鼠死亡, 死亡前大鼠出现精神萎靡, 进食、饮水较差, 活动减少, 体质量下降。 BMSCs移植组共有9只形成肝癌, 本实验肝癌造模成功率89.5%。

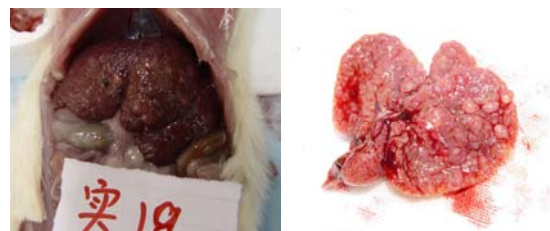
2.3 大鼠肝脏癌变过程中的大体变化 见图2。



a: The blank control group, the rat liver had smooth surface, pink color, sharp-edge and soft texture



b: The pure model group, the surface of the rat liver was rough and there were a number of nodular space-occupying lesions



c: The bone marrow mesenchymal stem cells transplantation group, the surface of the rat liver was rough, the edge was ragged, and nodular space-occupying lesions proliferated

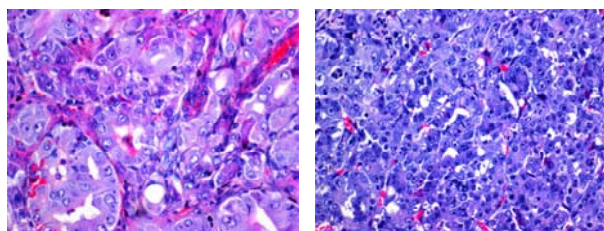
Figure 2 General changes of the liver during hepatocarcinogenesis of rats in each group

图2 各组大鼠肝脏癌变过程中的大体变化

空白对照组大鼠肝脏表面光滑, 色淡红, 边缘锐利, 质地软; 实验结束时, 单纯造模组大鼠肝脏表面略粗糙,

质地稍硬,可见多个大小不一的灰白色结节,结节大小在0.1~0.4 cm, BMSCs移植组可见肝脏边缘不整,肝脏硬度较单纯造模组增加,表面和切面呈弥漫性全肝小结节,亦可见囊性变、出血和坏死,

2.4 大鼠肝脏癌变过程中的苏木精-伊红染色病理变化 空白对照组大鼠肝脏镜下见肝细胞膜完整,胞核清晰,汇管区肝细胞排列整齐; BMSCs移植组镜下见肝细胞轻度水肿,明显脂肪变性,正常肝小叶结构被破坏,假小叶形成,中央小叶静脉周围肝索排列欠规整,肝细胞排列紊乱,伴有变性、坏死、淋巴细胞和单核细胞浸润,可见较多白色结节,病理证实为肝癌细胞,癌细胞呈多形性,异形性明显,胞核增大且深染,少数细胞有双核,胞质少。而单纯造模组肝小叶结构破坏较轻,肝细胞轻度脂肪变性、坏死,可见癌细胞存在,其分化程度较高,异性性较低,汇管区内可见少量炎性细胞浸润,见图3。

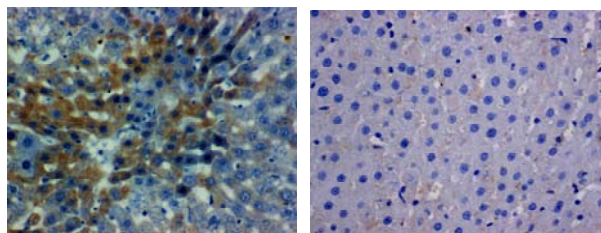


a: BMSCs transplantation group b: Pure model group

Figure 3 Damaged hepatic lobule, liver cells arranged in disorder and absence of the central vein occurred in bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) transplantation and pure model groups which indicated that liver cancer occurred (Hematoxylin-eosin staining, $\times 400$)

图 3 BMSCs 移植组和单纯造模组大鼠肝脏均可见正常肝小叶结构被破坏,肝细胞排列紊乱,中央静脉缺如,提示肝癌形成(苏木精-伊红染色, $\times 400$)

2.5 BMSCs移植组大鼠肝脏SrY阳性细胞检测 通过干细胞追踪可以了解移植后干细胞在受体内存活和分布情况,见图4。



a: The BMSCs transplantation group, successful BMSCs transplantation with a lot of positive cells b: The pure model group, none positive expression was seen because of no BMSCs injection

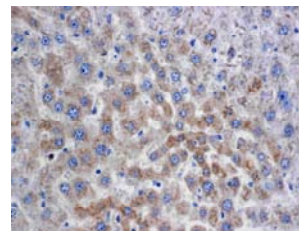
Figure 4 Histological changes of the rat livers in the bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) transplantation and the pure model groups (SrY *in situ* hybridization, $\times 400$)

图 4 BMSCs 移植组和单纯造模组大鼠肝脏组织变化(SrY原位杂交, $\times 400$)

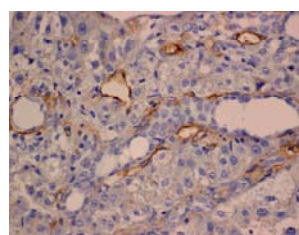
根据SrY原位杂交检测后,发现BMSCs移植组大鼠

肝脏组织可见胞浆内大量阳性细胞的存在,而空白对照组和单纯造模组未注射干细胞,无阳性表达。

2.6 大鼠肝脏VEGF与微血管密度的表达 空白对照组大鼠肝脏中可见少量VEGF阳性和微血管密度表达,见图5。



a: Low expression of VEGF in the liver

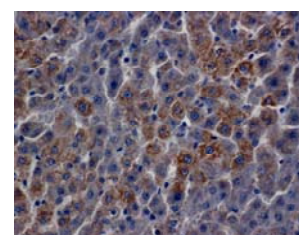


b: Expression of MVD in the liver

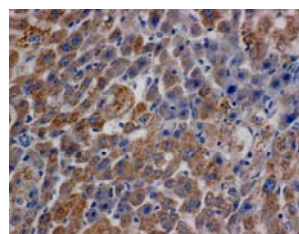
Figure 5 Low expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvessel density (MVD) were seen in the blank control group (strept activin-biotin complex method, $\times 400$)

图 5 空白对照组大鼠肝脏中可见少量血管内皮细胞生长因子及微血管密度的表达(SABC法, $\times 400$)

单纯造模组可见较多的VEGF阳性表达,而BMSCs移植组VEGF表达较单纯造模组明显增多,见图6。



a: Pure model group

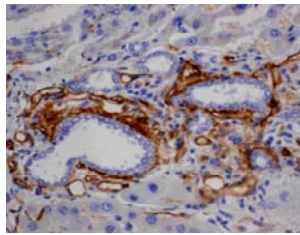


b: BMSCs transplantation group

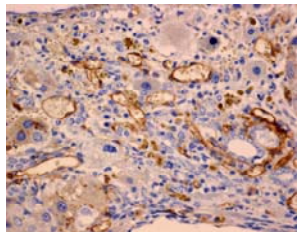
Figure 6 High expression of vascular endothelial growth factor in the pure model group and much higher expression in the bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) transplantation group (strept activin-biotin complex method, $\times 400$)

图 6 单纯造模组见较多血管内皮细胞生长因子表达, BMSCs 移植组血管内皮细胞生长因子阳性表达明显增多(SABC法, $\times 400$)

单纯造模组微血管密度阳性表达较空白对照组增多, 而BMSCs移植组阳性表达较单纯造模组增多, 见图7。



a: Pure model group



b: BMSCs transplantation group

Figure 7 High expression of microvessel density was seen in the pure model group compared with the blank control group, and greater microvessel density was seen in the bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) transplantation group compared with the pure model group (strept actividin-biotin complex method, $\times 400$)

图7 单纯造模组可见微血管密度阳性表达较空白对照组增多, 而BMSCs移植组微血管密度阳性表达较单纯造模组明显增加 (SABC法, $\times 400$)

空白对照组在MRI上未见异常信号; BMSCs移植组和单纯造模组MRI结节数相比 $t=2.45$, $P=0.026$; 3组VEGF及微血管密度比较, 差异均有显著性意义 ($F=16.19$, $P<0.01$; $F=14.16$, $P<0.01$), 见表1, 图8。

表1 各组大鼠肝脏MRI、血管内皮细胞生长因子和微血管密度表现对比

Table 1 Comparison of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvessel density (MVD), as well as MRI of rat livers in each group ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	MRI (%)	VEGF (%)	MVD (n)
Blank control	10	0	4.33 $\pm$ 1.91	1.57 $\pm$ 0.86
Pure model	9	2.89 $\pm$ 2.71	13.27 $\pm$ 7.22	4.04 $\pm$ 1.52
BMSCs transplantation	10	6.50 $\pm$ 3.69	27.9 $\pm$ 14.22	8.46 $\pm$ 4.69

There were liver cirrhosis rats in the bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) transplantation group and the pure molding group which were not involved in the statistical analysis; comparison of VEGF, BMSCs transplantation group: Pure model group $t=2.87$, $P=0.013$; pure model group: blank control group $t=3.78$, $P=0.001$; BMSCs transplantation group: blank control group $t=5.19$, $P=0.001$; comparison of MVD, BMSCs transplantation group: pure model group $t=2.69$, $P=0.015$; pure model group: blank control group $t=4.3$, $P=0.001$; BMSCs transplantation group: blank control group $t=4.57$, $P<0.01$

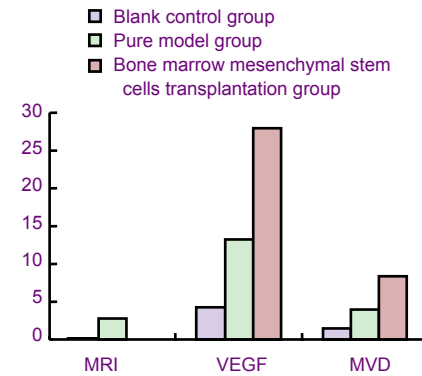


Figure 8 Comparison of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and microvessel density (MVD), as well as MRI of rat livers in each group

图8 各组微血管密度、血管内皮细胞生长因子(%)和MRI的对比

2.7 VEGF与微血管密度表达的相关性分析 Spearman等级相关分析显示, 空白对照组、BMSCs移植组和单纯造模组的微血管密度与VEGF的表达成正相关($r=0.723$, $P<0.01$)。

3 讨论

恶性肿瘤的生长具有明显的血管生成依赖性, 新生血管是肿瘤快速生长的物质和形态学基础^[6]。本研究认为BMSCs促进了肝癌的血管生成而促进了肝癌的生长, 所以主要从VEGF、微血管密度和MRI方面讨论BMSCs对肝癌血管形成的影响。

MRI是检查肝脏各种损伤及占位病变中较准确的检查方法之一。Ebara等^[7]认为, T1WI所呈现的结节信号特征与癌组织分化程度、肿瘤的性质有相关性, T1WI高信号者多分化较好, 而低信号者常分化较差。本实验采用国内较先进机型3.0T磁共振判断BMSCs移植组和单纯造模组的差别, 结果显示空白对照组大鼠肝脏未见异常信号表现; BMSCs移植组大鼠T1WI可见较多稍低或等信号的占位病变, 在T2WI占位性病变表现为高信号; 单纯造模组T1WI可见较少的低信号占位病变, 在T2WI可见少数高信号占位病变; BMSCs移植组实性占位性病变明显较单纯造模组增多, 两组相比有统计学意义, 初步从影像学上判断BMSCs促进了肝癌的生长。

VEGF是最为重要的血管生成刺激因子, 通过与内皮细胞上的特异受体结合而促进内皮细胞增殖, 在诱导肿瘤血管生成中起着重要作用^[8]。VEGF作为血管内皮细胞特异的有丝分裂原, 对内皮细胞的生长有直接的刺激和趋化作用, 是目前已知最强烈的血管发生蛋白, 促进包括肝癌在内的多种肿瘤新生血管的形成及瘤体生长^[9]。本实验中BMSCs移植组VEGF阳性表达率明显高于单纯造模组, 两组相比差异有显著性意义, 同样说明BMSCs促进了肝癌血管的生长这一观点。

肿瘤微血管密度是衡量肿瘤血管生成的金标准^[10],与肿瘤的浸润转移及预后有着十分密切的关系。肝细胞肝癌是一种富血供的肿瘤,肝脏肿瘤血管的生成被认为在易感个体发生HCC的过程中起重要作用,另外肝癌的生长与转移也需要持续刺激新的毛细血管的生长^[11]。肿瘤血管生成通过测定微血管密度可反映肝癌的血管生成^[12]。因此,抗血管生成是目前肿瘤治疗研究中的热点。干细胞移植作为治疗终末期肝病的手段,已经越来越引起临床的关注^[13]。因此本实验检测了CD34标记的微血管密度值变化。研究认为,CD34能显示极微小的肿瘤新生血管,具有更高的特异性和敏感性,优于内皮细胞的其他标记物^[14]。本实验结果发现CD34在单纯造模组有少量表达,相反,间充质干细胞干预组有较多数量的微血管阳性表达,提示间充质干细胞促进了血管的生成;同时发现,微血管密度与VEGF两者的表达明显呈正相关,微血管密度越高,新生血管化程度越活跃,VEGF表达明显,显示了VEGF的表达与新生血管化部位的一致性,说明VEGF作为一个调节因子与肝癌微血管的生成密切相关。总之,本实验认为在肿瘤形成时,骨髓间充质干细胞可通过先分化为血管内皮细胞而促进肝癌组织血管生成,从而加速肝癌的生长。因此,减少血管形成在肝癌的治疗中具有重要的现实意义。

4 参考文献

- [1] Jiang CP. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi. 2009;17(8):743-746. 江春平. 未来肝癌治疗的新靶点-肝癌干细胞[J]. 世界华人消化杂志, 2009,17(8):743-746.
- [2] Niu J, Liu B, Zhang YW, et al. Zhonghua Yizhi Zazhi. 2009;3(2):31-34. 牛坚,刘斌,张业伟,等. hIL-10基因修饰骨髓间充质干细胞对肝移植大鼠排斥反应的影响[J]. 中华移植杂志, 2009,3(2):31-34.
- [3] Ji WZ, Ma Y, Wen H, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(36):6744-6750. 纪卫政,马艳,温浩,等. 骨髓间充质干细胞移植急性放射性肝损伤大鼠 α -平滑肌肌动蛋白的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(36):6744-6750.
- [4] Xie YH, Yuan MB. A relationship between cyclooxygenase-2 expression and tumor angiogenesis in experimental rat liver carcinogenesis. Zhonghua Ganzangbing Zazhi. 2006;14: 676-679.
- [5] Wang BF, Cheng YA, Wang XJ, et al. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi. 2008;16(12):1273-1280. 王宝峰,程延安,王西京,等. 柴胡皂甙D对实验性大鼠肝癌血管形成的抑制作用[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(12):1273-1280.
- [6] Yoshiji H, Kuriyama S, Noguchi R, et al. Amelioration of carcinogenesis and tumor growth in the rat liver by combination of vitamin K2 and angiotensin-converting enzyme inhibitor via antiangiogenic activities. Oncol Rep. 2006;15(1):155-159.
- [7] Ebara M, Fukuda H, Kojima Y, et al. Small hepatocellular carcinoma: relationship of signal intensity to histopathologic findings and metal content of the tumor and surrounding hepatic parenchyma. Radiology. 1999;210(1):81-88.
- [8] Zhang ZL, Liu ZS, Sun Q. Zhonghua Shiyao Waike Zazhi. 2006; 23(12):1492-1494. 张中林,刘志苏,孙权. 血管内皮生长因子和促血管生成素及其受体 Tie2在肝细胞癌发生发展中的作用[J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23(12):1492-1494.
- [9] Wu YG, Wang YY. Zhongliuxue Zazhi. 2010;16(3):214-216. 吴岳光,王元宇. 缺氧诱导因子-1 α 、VEGF表达与胃癌肝转移及肿瘤血管生成的关系[J]. 肿瘤学杂志, 2010, 16(3):214-216.
- [10] D'Onofrio M, Malago R, Zamboni G, et al. Contrast-enhanced ultrasonography better identifies pancreatic tumor vascularization than helical CT. Pancreatol. 2005;5(4-5):398-402.
- [11] Li L, He BW, Shang HL, et al. Shanxi Yixue Zazhi. 2007;36(6): 667-669. 李莉,贺伯伟,尚红利,等. 肝癌中血管内皮生长因子及 α -平滑肌肌动蛋白的表达与临床意义[J]. 陕西医学杂志, 2007, 36(6):667-669.
- [12] Yuan H, Wang D, Chen HY, et al. Zhongguo Linchuang Yixue Yingxiangxue Zazhi. 2009;20(4):255-257. 袁惠,王丹,陈红艳,等. 肝细胞性肝癌超声造影定量参数与微血管密度的相关性研究[J]. 中国临床医学影像杂志, 2009, 20(4):255-257.
- [13] Liang CY, Qin SY, Jiang HH, et al. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi. 2009;17(12):1178-1184. 梁昌宇,覃山羽,姜海行,等. 骨髓间充质干细胞对大鼠急性肝损伤修复的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(12):1178-1184.
- [14] Chen XG, Qian F, Zhang L, et al. Zhonghua Qiguan Yizhi Zazhi. 2006;27(10):615-618. 陈新国,钱峰,张力,等. 检测抗CD34抗体标记的肿瘤微血管密度预测肝癌肝移植术后复发[J]. 中华器官移植杂志, 2006, 27(10):615-618.

来自本文课题的更多信息一

基金声明: 新疆医科大学第一附属医院科研基金 (2009GXB02)。

作者贡献: 第一作者进行实验设计,第二、三、四作者进行实施,第五作者进行实验评估,资料收集为第一、二作者,第五作者成文,第二作者审核,第一、五作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 实验已由新疆医科大学第一附属医院实验动物伦理审核委员会审核通过。

本文创新性: 实验通过骨髓间充质干细胞移植从影像学、病理组织学及免疫组织化学方面观察大鼠肝癌形成过程中的肝脏血管变化,通过检测血管内皮细胞生长因子及微血管密度能准确的了解骨髓间充质干细胞移植是否促进了肝脏血管的生成从而促进了肝癌的生长,并运用国内较先进的GF-SIGNA-HDXT-3.0T 磁共振机观察实验结果,提高了实验的准确性,这在国内目前还很少见相关研究报道。