

普萘洛尔影响血管瘤干细胞向脂肪分化的研究

王献路^{1,2}, 娄寅¹, 陈增红¹, 曹东升¹

摘要 目的 探讨普萘洛尔(PRN)对体外培养的血管瘤干细胞(HemSCs)向脂肪细胞转化时的作用与影响。方法 使用CD133免疫磁珠分离技术体外培养和传代HemSCs并鉴定;PRN干预后,通过油红O染色观察PRN对HemSCs脂化作用的影响,并运用Real Time PCR法和Western blot法检测HemSCs脂化相关指标C/EBP α 、PPAR γ 和C/EBP β 的表达情况。结果 成功分离培养HemSCs,油红O染色结果显示PRN组较对照组红色脂滴数更多,形状更圆更大,Real Time PCR和Western blot法检测均显示PRN组的脂化相关指标表达水平高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 在体外实验中,PRN促进HemSCs向脂肪细胞分化。

关键词 血管瘤干细胞;普萘洛尔;脂肪分化

中图分类号 R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)08-0711-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.05.011

婴幼儿血管瘤(infantile hemangiomas, IHs)是婴幼儿时期最常见的良性肿瘤,全世界范围内的发病率高达4%~10%^[1]。2008年,Léauté-Labrèze et al^[2]发现普萘洛尔(Propranolol, PRN)可对IHs产生治疗效果。时至今日,PRN已渐渐替代激素成为治疗IHs的一线药物。同样在2008年,血管瘤干细胞(hemangioma stem cells, HemSCs)被Khan et al^[3]首次报道,并在裸鼠上重建了独特的IHs演变过程,提示HemSCs可能是IHs的来源细胞。近年来,关于PRN治疗IHs的研究大多数是围绕HemSCs开展的,取得了一些成果^[4-5],但是对于其治疗机制尚无突破性进展。IHs的自然发展最终是以纤维脂肪组织出现代替增生的血管组织为特征性表现的,临床上也发现,使用PRN治疗IHs数月后再次行手术切

除的患儿,术中切除的瘤体组织表面呈现IHs特征性的鲜红色圆形凸起,但深部会有大量脂肪组织存在,与消退阶段出现大量脂肪细胞的特征相似,但时间进程上却大大提前。由此推测,PRN可能是通过影响HemSCs向脂肪细胞分化从而治疗血管瘤的。该研究通过对HemSCs进行体外提取与培养,检测PRN干预HemSCs时脂化相关因子的变化,旨在为IHs的治疗提供新的思路与方法。

1 材料与方法

1.1 血管瘤标本 经安徽医科大学第二附属医院伦理委员会批准,征得患儿家属同意并签署知情同意后,收集安徽医科大学第二附属医院整形外科手术切取的未进行任何治疗的增殖期血管瘤新鲜标本,共2例,经安徽医科大学第二附属医院病理科确诊为增殖期血管瘤。HemSCs的获取依据Khan et al^[3]的方法,从增生期血管瘤组织中分离并培养,取第4~10代血管瘤干细胞进行实验。

1.2 主要试剂与仪器 MS分选柱、CD133免疫磁珠试剂盒(德国Miltenyi公司);DMEM培养基、胎牛血清(FBS)(美国Hyclone公司);盐酸普萘洛尔(美国Sigma公司);鼠抗人CD31、CD90、CD105抗体(美国Biolegend公司);胎儿骨髓间质干细胞成脂诱导分化培养基试剂盒、油红O染色试剂盒(广州赛业生物科技有限公司);Real Time PCR试剂盒(日本TaKaRa公司);脂肪分化指标的一抗(C/EBP α 、C/EBP β 、PPAR γ)(武汉博士德生物公司);光学显微镜(日本Olympus公司);流式细胞仪(美国Beckman公司);Real Time PCR仪(美国ABI公司)。

1.3 血管瘤干细胞的分选与培养 手术切取新鲜增殖期血管瘤组织,立即浸入4℃的DMEM/20%胎牛血清(FBS)+1%青霉素-链霉素(PS)的培养基中,然后迅速送到实验室。大量的PBS冲洗标本后,剪除皮肤、脂肪、血凝块及其他非瘤体组织,并留取明确的血管瘤组织。将未经处理的血管瘤组织用剪刀切碎成小组织块,浸入0.2%胶原酶中,37℃水箱中消化约1.5~2h,弃上清液,DMEM重悬,通过100 μ m的细胞滤网过滤后获得单细胞悬液。加

2018-01-25 接收

基金项目:科技厅公益性技术应用研究联动计划项目(编号:15011d04048);安徽医科大学校临床科学研究项目(编号:2015xkj026)

作者单位:¹安徽医科大学第二附属医院整形外科,合肥 230601

²太和县人民医院美容科,太和 236600

作者简介:王献路,男,硕士研究生;

曹东升,男,主任医师,副教授,博士生导师,责任作者,E-mail: dscao1966@126.com

入 CD133 磁珠 4 °C 避光孵育 30 min ,PBS 清洗 ,弃上清液 ,重悬后 ,流入分选柱 ,通过 CD133 标记的免疫磁珠技术提纯 CD133(+) HemSCs ,收集细胞 ,然后培养于 EGM-2/20% FBS + 1% PS 培养基中。通过细胞计数法计算 HemSCs 提取率^[6]。培养 48 h 后 ,更换培养液 ,去除漂浮的细胞和未标记的磁珠。当原代细胞汇合成片铺满培养瓶时 ,用胰蛋白酶消化技术培养 HemSCs 并在体外传代培养。第 4 ~ 10 代 HemSCs 用于实验研究。

1.4 形态学观察 通过倒置显微镜 ,观察 HemSCs 接种在 96 孔培养板上 24 h 和 48 h 后细胞的形态。随着细胞代数的增加 ,可以观察到 HemSCs 的形态学的改变。

1.5 流式细胞术鉴定血管瘤干细胞 使用 PE 小鼠抗人 CD31、CD90、CD105 抗体进行检测。收集第 3 代 HemSCs ,细胞浓度调整为 1×10^7 个/ml。离心管为对照 ,CD31、CD90、CD105 ,加入 500 μ l 细胞悬液 ,后加入 5 μ l 相应抗体 4 °C 避光孵育 30 min。清洗细胞 2 次后加入 600 μ l PBS ,然后通过流式细胞术进行上机检测。Cytomics CXP 软件分析数据。

1.6 油红 O 染色检测 HemSCs 的成脂转化 收集对数生长期的 HemSCs ,调整 HemSCs 浓度为 1×10^5 个/ml ,接种于 6 孔板中。隔天换液待 HemSCs 生长到 90% 融合 ,用培养基 A 液即诱导培养基将 PRN 稀释成不同浓度 (50 μ mol/L、100 μ mol/L) ,替换原培养液 ,对照组加入培养基 A 液 ,实验组加入不同浓度的 PRN 溶液 3 d 后更换为培养基 B 液即基础培养基 ,培养 24 h 后更换培养基 A 液继续诱导。培养基 A 液和 B 液交替培养至脂滴变得足够大而圆后 ,PBS 冲洗 ,4% 中性甲醛溶液固定 30 min 后 ,再次 PBS 冲洗 ,加入 1 ml 油红 O 染料工作液 30 min ,弃去油红 O 染液 ,用 PBS 冲洗后显微镜下观察细胞成脂染色效果并拍照。

1.7 Real Time PCR 法检测 HemSCs 脂肪分化的相关指标 提前染毒 HemSCs (对照组和实验组 ,实验组: 50 μ mol/L、100 μ mol/L PRN 溶液) ,用 TRIzol 溶液提取 RNA。将提取的总 RNA ,反转录试剂盒 ,RNase Free dH₂O 置于冰上 ,按照试剂盒说明书进行操作 ,反转录为 cRNA。在 Pubmed 上选择 Gene 数据库搜索相关基因 ,以人 ACTB 内参引物 (NO. B661102) 作为内参照 ,PCR 引物序列见表 1。以 cDNA 链为模板进行 PCR 反应 ,进行两步法 PCR 扩增标准程序: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 5 s、60 °C 34 s ,扩增 40 个循环。反应结束后 ,确认 Real Time

PCR 的扩增曲线和融解曲线 ,分析结果。

表 1 PCR 使用引物列表

引物名	引物序列(5'-3')
PPAR γ	F: TCTCCAGCATTTCTACTCCACA R: CAGGCTCCACTTTGATTGC
C/EBP α	F: TGGACAAGAACAGCAACGAG R: TTGTCACCTGGTCAGCTCCAG
C/EBP β	F: TTTCCGAAGTTGATGCAATCG R: CAACAAGCCCGTAGGAACAT

1.8 Western blot 法检测 HemSCs 脂肪分化的相关指标 提前染毒 HemSCs (对照组和实验组 ,实验组: 50 μ mol/L、100 μ mol/L PRN 溶液) ,RIPA 裂解液裂解并提取蛋白质 ,BCA 法蛋白定量后 ,SDS-PAGE 电泳分离 ,电泳条件: 60 V、30 min; 120 V、1.5 h。电泳结束后 ,将蛋白转移至 PVDF 膜上 ,5% 脱脂牛奶封闭 1 ~ 4 h ,TBST 洗膜 3 次 ,每次 10 min ,一抗室温孵育 1 ~ 3 h ,TBST 洗膜 3 次 ,每次 10 min ,加入二抗 ,室温孵育 1 ~ 3 h ,TBST 洗膜 3 次 ,每次 10 min ,化学发光 显影。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析 ,组间显著差异采用 *t* 检验 ,*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HemSCs 的提取率 使用 CD133 免疫磁珠分离技术 ,从婴幼儿增殖期血管瘤标本中分离出 HemSCs ,运用细胞计数法计算 HemSCs 提取率分别为 0.27% 和 0.18% (样品 1 和 2) ,平均约 0.36%。

2.2 HemSCs 的形态观察 HemSCs 接种在 96 孔板中 ,显微镜下观察细胞形态 ,显示细胞呈圆形 ,同时可看到许多圆形透亮的未标记 CD133 的免疫磁珠。24 h 后再次观察 ,显示圆形细胞开始变成椭圆形 ,长条形 ,形状多样且不规则 (图 1A)。48 h 后 ,不规则形状的细胞已经变成长梭形扩散于孔板中 (图 1B) ,同时可看到许多圆形透亮的未标记 CD133 的免疫磁珠和大量未贴壁的死细胞。形态学观察表明 ,HemSCs 的形态呈长梭形 ,类似于间充质干细胞的形态。其中第 4 代 HemSCs 细胞排列呈螺旋形漩涡状排列 (图 1C)。随着代数的增加 ,HemSCs 的形态从长主轴变为三角形 ,四边形和不规则形状。第 8 代 HemSCs 仍然具有强大的增殖和集落形成能力 (图 1D)。

2.3 流式细胞术检测细胞表型 流式细胞术结果表明提取的细胞高度表达 CD90 (98.8%) 和 CD105

(97.8%) ,但不表达 CD31 (0.7%) (图2) ,符合 HemSCs 的细胞表型。

2.4 HemSCs 的成脂诱导和油红 O 染色 油红染色显示 ,HemSCs 在脂肪培养基培养 12 ~ 15 d 后 ,细胞质内有许多红色脂滴形成。对照组的红色脂滴数较实验组少 ,且体积偏小 ,像花环一样围绕着细胞核

一圈。而实验组细胞质内的红色脂滴像葡萄串样聚集在一起 ,形状更圆更大(图3) 。且随着 PRN 浓度的上升 ,100 $\mu\text{mol/L}$ 组较 50 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞质内红色脂滴数量有增加趋势(图3B、3C) 。另外还观察到实验组与对照组相比 ,HemSCs 的数目和密度有减少趋势(图3A、3C) 。

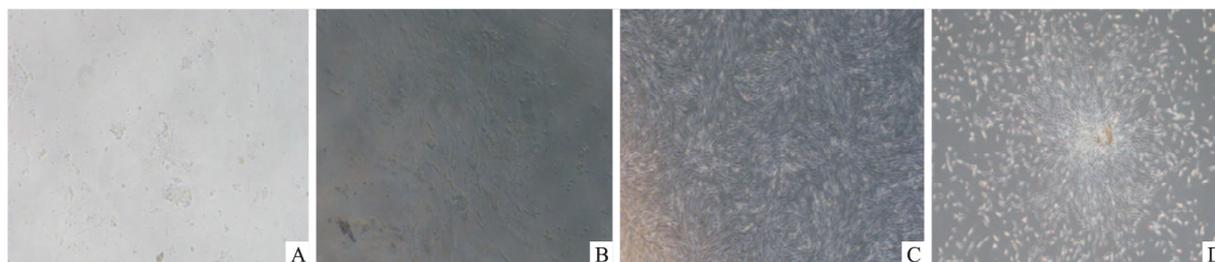


图1 血管瘤干细胞形态观察 SP \times 100

A: 接种 24 h 后; B: 接种 48 h 后; C: 第 4 代 HemSCs; D: 第 8 代 HemSCs

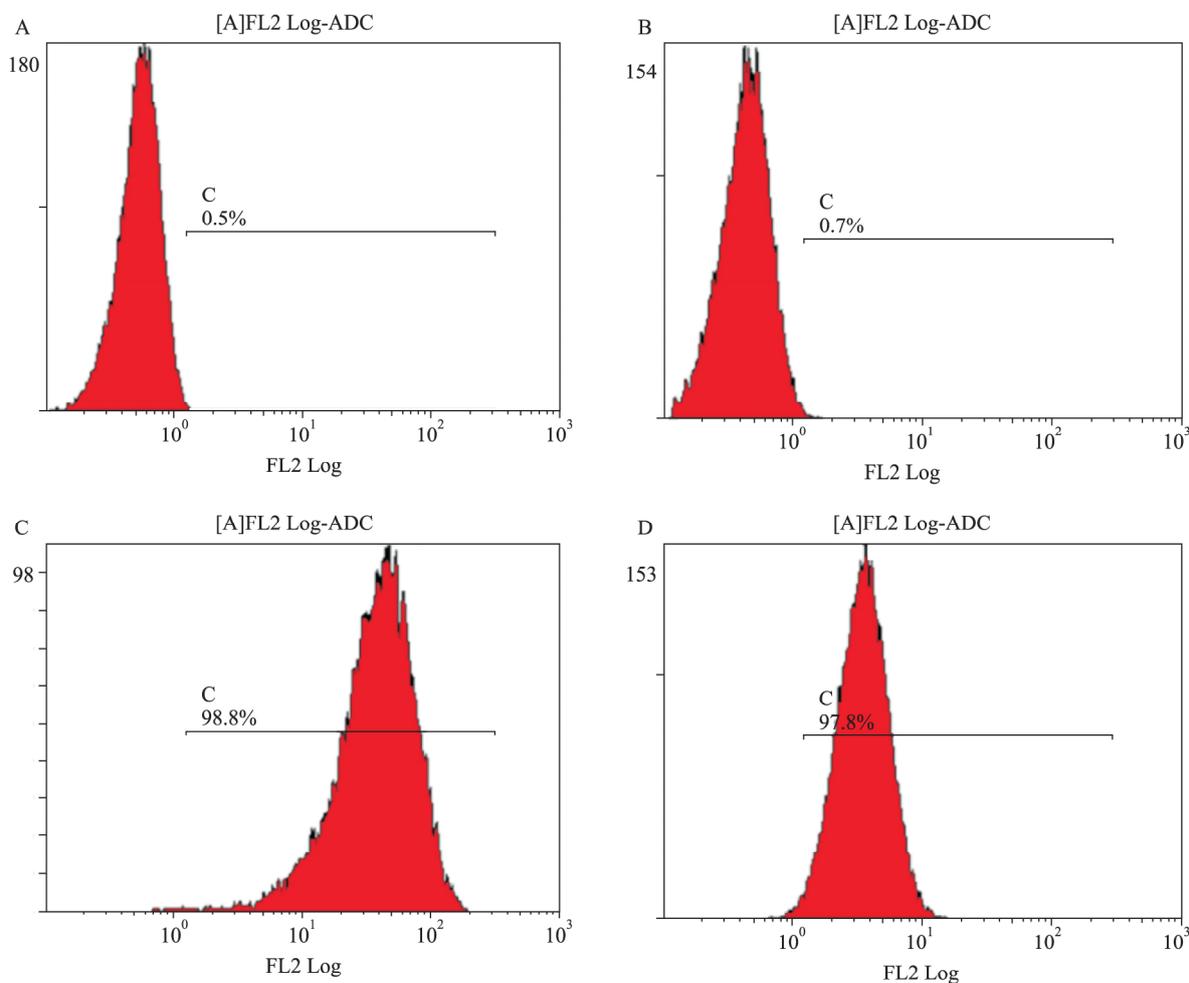


图2 流式细胞术检测血管瘤干细胞表型

A: 对照组; B: CD31; C: CD90; D: CD105

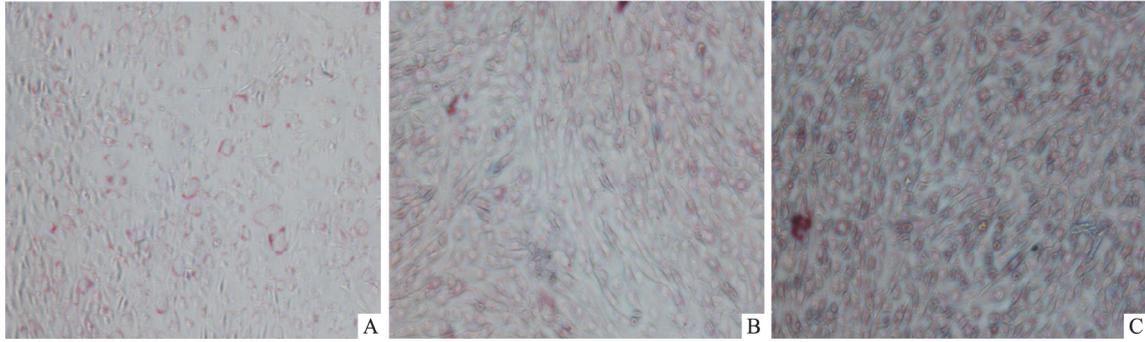


图3 血管瘤干细胞的成脂诱导和油红 O 染色 SP × 200
A: 对照组; B: PRN 50 μmol/L 组; C: PRN 100 μmol/L 组

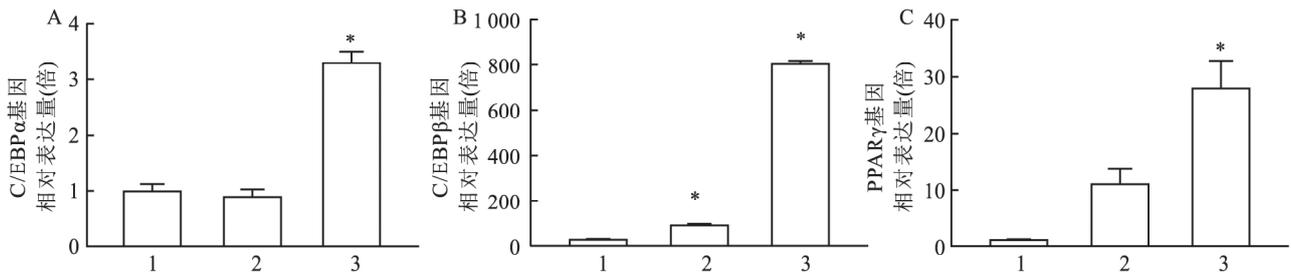


图4 Real Time PCR 检测各组 C /EBPα、PPARγ 和 C /EBPβ 表达情况

A: C/EBPα; B: C/EBPβ; C: PPARγ; 1: 对照组; 2: 50 μmol/L PRN 组; 3: 100 μmol/L PRN 组; 与对照组比较: * P < 0.05

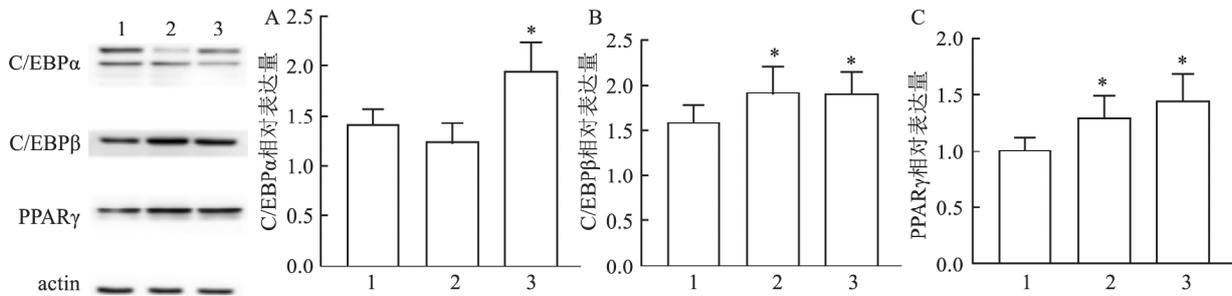


图5 Western blot 法检测各组 C /EBPα、PPARγ 和 C /EBPβ 的表达情况

A: C/EBPα; B: C/EBPβ; C: PPARγ; 1: 对照组; 2: 50 μmol/L PRN 组; 3: 100 μmol/L PRN 组; 与对照组比较: * P < 0.05

2.5 Real Time PCR 法检测 HemSCs 脂肪分化的相关指标 C /EBPα 指标在 50 μmol/L PRN 溶液干预后,与对照组相比差异无统计学意义 (P > 0.05),但是在 100 μmol/L PRN 溶液干预后,与对照组相比 RNA 水平上升,是对照组的 3.2 倍,差异具有统计学意义 (P < 0.05)。PPARγ 和 C/EBPβ 指标经 50 μmol/L 和 100 μmol/L PRN 溶液干预后,与对照组相比 RNA 水平都显著上升,差异具有统计学意义 (P < 0.05) (图 4)。

2.6 Western blot 法检测 HemSCs 脂肪分化的相关指标 HemSCs 经不同浓度 PRN 溶液干预后,Western blot 法检测 HemSCs 脂肪分化相关指标蛋白表达水平改变趋势与 Real Time PCR 法检测

HemSCs 脂肪分化相关指标 RNA 水平变化相一致 (图 5)。

3 讨论

IHs 是儿童时期最常见的良性血管肿瘤,由紊乱的血管和不成熟的血管细胞组成。2008 年 PRN 治疗血管瘤被发现,经过近十年的大量研究,PRN 已经代替激素成为治疗 IHs 的突破性治疗方法。但是关于其治疗机制仍然不清楚。在此之后,HemSCs 被 Khan et al^[3]从血管瘤瘤体组织中成功分离,并重建了独特的 IHs 演变过程,学者们才把目光集中到 HemSCs 的研究上来。Boye et al^[7]认为血管瘤是 HemSCs 分化为内皮细胞的表型而形成。

IHs 的生物过程复杂,有自行消退的特点,通常表现为3个不同的阶段,即增殖阶段、消退阶段以及消退完成阶段^[8]。消退完成时,其特征性表现是纤维脂肪组织包绕塌陷的血管结构,这些独特的生理特点明显区别于血管畸形。Khan et al^[3]在进行 HemSCs 研究时也发现,HemSCs 在消退期会分化为脂肪细胞。脂化通常与 C/EBP α 、C/EBP β 以及 PPAR γ 这3种因子相关。当特定细胞接收到脂肪转化相关信号后,转录因子 C/EBP β 表达增加,诱导 C/EBP α 和 PPAR γ 上调,促进与脂肪形成有关的基因表达增加,加速脂化过程。

本研究中,参考 Khan et al^[3] 的 HemSCs 分选培养方法,并稍作修改,使胶原酶的消化时间从 30 min 延长至 1.5~2 h,目的是为了提高单细胞悬液的质量,进而提高 HemSCs 的提取产率。而后采用流式细胞术检测其细胞表型,细胞高度表达干细胞标志物 CD90 和 CD105,但不表达血管瘤内皮细胞标志物 CD31,证实培养的细胞为 HemSCs。HemSCs 经成脂诱导分化培养基作用后,油红染色显示细胞质内有许多红色脂滴形成,并且实验组内的红色脂滴与对照组相比数量多且形状更大更圆,证实 HemSCs 有向脂肪细胞分化的潜能,并且 PRN 干预后,加速了 HemSCs 的脂化。随后用 Real Time PCR 法和 Western blot 法检测不同浓度 PRN 溶液干预下 HemSCs 脂化相关指标的变化,结果显示 PPAR γ 和 C/EBP β 指标经 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ PRN 溶液干预后,与对照组相比 RNA 及蛋白水平都显著上升,差异具有统计学意义。C/EBP α 指标在 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ PRN 溶液干预后,与对照组相比,趋势不一致。虽然 C/EBP α 在 50 $\mu\text{mol/L}$ PRN 溶液干预下相比于对照组 RNA 水平有所下降,但差异无统计学意义,C/EBP α 在 100 $\mu\text{mol/L}$

PRN 溶液干预后,与对照组相比 RNA 水平上升,差异具有统计学意义。这些结果与成脂诱导分化后油红 O 染色结果相一致,从侧面验证了实验的假设。

IHs 的发生在临床上很常见,不仅给患儿带来了生理和心理上的巨大的痛苦,也给家庭和社会带来了沉重的经济负担。此次的研究成果有助于揭示 PRN 治疗 IHs 的机制,也将为临床上更好的运用 PRN 治疗血管瘤提供理论新依据。

参考文献

- [1] Boye E, Jinnin M, Olsen B R. Infantile hemangioma: challenges, new insights, and therapeutic promise [J]. J Craniofac Surg, 2009, 20 Suppl 1: 678-84.
- [2] Léauté-Labrèze C, Dumas de la Roque E, Hubiche T, et al. Propranolol for severe hemangiomas of infancy [J]. N Engl J Med, 2008, 358(24): 2649-51.
- [3] Khan Z A, Boscolo E, Picard A, et al. Multipotential stem cells recapitulate human infantile hemangioma in immunodeficient mice [J]. J Clin Invest, 2008, 118(7): 2592-9.
- [4] 麦华明, 郑家伟, 张凌, 等. 普萘洛尔对血管瘤中 HemSC 凋亡和 VEGF、bFGF 表达的影响及临床意义 [J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2013, 11(4): 287-96.
- [5] Zhang L, Mai H M, Zheng J, et al. Propranolol inhibits angiogenesis via down-regulating the expression of vascular endothelial growth factor in hemangioma derived stem cell [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 7(1): 48-55.
- [6] Mai H M, Zheng J W, Wang Y A, 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.
- [7] Boye E, Yu Y, Paranya G. Clonality and altered behaviour of endothelial cell from hemangiomas [J]. Clin Invest, 2001, 107(6): 745-52.
- [8] Todorovich S M, Khan Z A. Elevated T-box 2 in infantile hemangioma stem cells maintains an adipogenic differentiation-competent state [J]. Dermatol Endocrinol, 2013, 5(3): 352-7.

Effect of propranolol on the differentiation of hemangio cells into adipocytes

Wang Xianlu^{1,2}, Lou Yin¹, Chen Zenghong¹, et al

(¹Dept of Plastic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

²Dept of Cosmetic Surgery, People's Hospital of Taihe County, Taihe 236600)

Abstract Objective To explore the effect of propranolol (PRN) on differentiation of adipocytes from hemangioma stem cells (HemSCs) cultured *in vitro*. **Methods** CD133 immunomagnetic beads separation technique was used to isolate HemSCs. HemSCs were induced to differentiate into adipocytes, and the adipogenic differentiation effects of HemSCs were determined by oil red O staining. The adipogenic differentiation index of HemSCs was detected by

不同剂量单次照射下大鼠急性放射性心脏损伤模型的构建与评价

刘阳¹, 高世乐¹, 胡宗涛¹, 马金柯¹, 高杉²

摘要 目的 评估不同剂量单次照射构建大鼠放射性心脏损伤模型的科学性、合理性、可行性。方法 40只SD雄性大鼠随机分为正常、5 Gy、10 Gy、20 Gy、30 Gy组。直线加速器下照射大鼠心脏,剂量率为600 cGy/min,源皮距为100 cm,照射野2.0 cm×2.0 cm。照射后1周末和4周末,各组分别随机取4只大鼠,经右颈总动脉插管,测量血流动力学指标,后检测大鼠血清中心肌肌钙蛋白I(cTnI)含量,以及超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)活性;取心尖部组织行HE、Masson染色。结果 照射后1周,心脏血流动力学参数变化不明显,而cTnI、SOD、MDA指标差异明显($P < 0.05$)。照射后4周,5 Gy、10 Gy组心功能参数较正常组无明显变化,20 Gy和30 Gy组心功能指标变化明显($P < 0.05$),但两组间差别不大,cTnI、SOD、MDA指标与正常组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。HE染色结果显示4周末各剂量照射组有不同程度的病理学形态改变,Masson结果显示心肌间质和小血管周围有不同程度胶原纤维沉积改变。结论 在构建大鼠急性放射性心脏损伤模型时,不同剂量照射有其各自的特征。大鼠心脏在20 Gy单次剂量照射后,可较好观察到急性放射性心脏损伤的变化。氧化应激在RIHD的发生、发展中扮演重要角色。

关键词 放射性心脏损伤;大鼠;模型

中图分类号 R 73

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)05-0716-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.05.012

2018-01-30 接收

基金项目:南京军区面上项目(编号:15MS049)

作者单位:¹解放军第105医院肿瘤中心,合肥 230031

²安徽医科大学药理学教研室,合肥 230032

作者简介:刘阳,男,硕士研究生;

胡宗涛,男,副主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:

huxuyan@163.com

放疗是恶性肿瘤的综合治疗不可或缺的组成部分,食管癌、肺癌、乳腺癌、纵膈淋巴瘤等肿瘤组织在接受放射治疗时,与肿瘤组织毗邻的心脏也将受到不同剂量体积的照射,引起无或有临床症状的放射性心脏损伤(radiation-induced heart disease RIHD)^[1]。射线可破坏血管内皮细胞、微循环系统损伤,继而使心肌出现缺血性改变、炎性细胞浸润、局灶性或片状心肌纤维化,最终导致心脏结构和功能损伤^[2]。虽然因为放射治疗技术的提高等因素,使心脏受照的剂量大大减少,但是射线造成的心脏损伤仍然不容忽视^[3]。RIHD的各种并发症对肿瘤患者的生活质量和生存期产生很大影响。目前临床上对预防和治疗RIHD尚无明确的共识。因此如何模拟临床构建RIHD物实验模型,揭示放射性心脏损伤发生的可能机制,对防治RIHD有非常重要的作用。为构建急性RIHD的实验动物模型,该实验通过不同剂量单次照射大鼠心脏,通过不同指标来评价所构建模型的科学性、可操作性,并探讨大鼠氧化应激在RIHD中的作用,从而为下一步试验提供科学、可行的动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级SD(Sprague Dawley)雄性大鼠40只,8~12周,200~250 g,购自常州卡文斯实验动物有限公司。

1.2 主要实验试剂 大鼠心肌肌钙蛋白I(cardiac troponin I, cTnI)试剂盒(批号:2016-11-01)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(批号:2016-11-01)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(批号:2016-11-01)购自南京建成生物工程研

Real Time PCR and Western blot. **Results** HemSCs were successfully isolated from IH by CD133 immunomagnetic beads separation technique. The result of oil red O staining showed that the number of red lipid droplets in PRN group was more and larger than that in control group. Real Time PCR and Western blot showed that the expression level of lipid-related index in PRN group was higher than that in control group significantly($P < 0.05$). **Conclusion** PRN promotes the adipose differentiation of HemSCs, *in vitro* experiments.

Key words hemangioma stem cell; propranolol; adipose differentiation