

## Shh 在血管瘤中的表达及意义

伍尚敏<sup>1)</sup>, 洪晓娅<sup>1)</sup>, 王凌冰<sup>2)</sup>, 杨婷婷<sup>1)</sup>, 陈明<sup>1)</sup>, 王惠<sup>1)</sup>, 左万昌<sup>1)</sup>

(1) 昆明医科大学附属甘美医院整形美容科, 云南昆明 650011; 2) 昆明医科大学第二附属医院整形美容科, 云南昆明 650031)

**[摘要]** **目的** 测定音猬因子 (sonic hedgehog, Shh) 在血管瘤内皮细胞 (Hemangioma endothelial cells, HEC) 和脐静脉内皮细胞 (Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 中的表达, 探讨 Shh 与血管瘤及人脐静脉的关系. **方法** 采用实时荧光定量 PCR 方法, 对临床收集的 18 例手术切除的新鲜增生期血管瘤病变标本和 18 例新鲜脐静脉标本, 进行实时荧光定量 PCR 检测 Shh 表达水平. **结果** Shh 表达水平在增生期血管瘤明显升高, 与脐静脉比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ). **结论** Shh 可能促进血管瘤的生长, 可能对血管瘤的病理发生过程发挥作用, 但对脐静脉无作用.

**[关键词]** 血管瘤; Shh; 细胞因子; 荧光定量 PCR

**[中图分类号]** R622 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 08 - 0014 - 03

## Expression and Significance of Shh in Hemangioma

WU Shang - min<sup>1)</sup>, HONG Xiao - ya<sup>1)</sup>, WANG Ling - bing<sup>2)</sup>, YANG Ting - ting<sup>1)</sup>, CHEN Ming<sup>1)</sup>, WANG Hui<sup>1)</sup>, ZUO Wan - chang<sup>1)</sup>

(1) Dept. of Plastic Surgery, The Affiliated Calmette Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101; 2) Dept. of Plastic Surgery, The 2nd Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore expression of Shh in hemangioma endothelial cells and Human umbilical vein endothelial cells, so as to find out the relationship between Shh and hemangioma and Human umbilical vein.

**Methods** Fresh operative specimens were collected (18 hemangiomas in the proliferating phase and 18 ones were from Human umbilical vein) and were divided into 2 groups: hemangioma and Human umbilical vein. The expression of Shh was detected by PCR (real-time fluorescent quantitate polymerase chain reaction) method. Result The level of Shh expression in proliferating HEC (hemangioma endothelial cells) was higher than that in HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells) ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Shh may promote the growth of hemangioma and has effect on the proliferation of hemangioma, but has no such effect on human umbilical vein.

**[Key words]** Hemangioma; Shh; Cytokine; Real-time fluorescent quantitate polymerase chain reaction

血管瘤是一种血管生成性疾病, 主要病理表现是血管过度形成, 随后自发性新生血管退化, 其生长过程中存在明显的快速增生期和退化期, 但机制目前尚不完全清楚. 笔者采用实时荧光定量 PCR 对手术切除的不同生长时期血管瘤及新鲜健康脐静脉标本进行 Shh 表达水平的检测, 探讨

其在血管瘤发生发展中的作用, 为临床鉴别诊断和治疗血管瘤以及血管瘤增殖机制的探讨提供理论依据.

### 1 材料与方法

**[基金项目]** 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (2010C098)

**[作者简介]** 伍尚敏 (1972~), 女, 四川成都市人, 整形外科博士, 副主任医师, 主要从事整形美容临床与科研工作.

## 1.1 研究对象

收集昆明医科大学附属甘美医院及昆明医科大学附属第二医院整形外科 2009 年 10 月至 2011 年 12 月经手术切除的 18 例皮肤草莓状血管瘤组织 (临床诊断为血管瘤, 其中男 7 例, 女 11 例, 年龄 40 d ~ 8 岁, 平均为 1 岁 2 个月) 和 18 例正常孕妇正常生产之新鲜脐静脉作对照. 18 例患者及孕妇手术前未口服或注射过糖皮质激素, 无内分泌系统疾病史, 无肝炎、结核等病史及接触史. 取材前均征得患者及家属同意. 血管瘤标本在切除后、脐带在孕妇生产后半小时内送实验室.

## 1.2 血管瘤内皮细胞 (Hemangioma endothelial cells, HEC) 及脐静脉内皮细胞 (Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 的原代培养及传代

**1.2.1 HEC 的原代培养及传代** 将无菌标本送细胞培养室, 于超净工作台 (苏州苏净集团) 内去除皮肤和脂肪组织, 用 D-Hank's 液冲洗后剪切成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小的组织块, 将组织块置入培养瓶内行组织块法原代培养, 并行常规传代培养.

**1.2.2 HUVEC 的原代培养及传代** 将新鲜脐带送细胞培养室, 于超净工作台 (苏州苏净集团) 用 D-Hank's 液反复灌洗脐带至脐带呈白色, 用酶消化法原代培养脐静脉内皮细胞, 并行常规传代培养.

## 1.3 HEC 及 HUVEC 的检测

用形态学观察和第八因子相关抗原免疫组织化学染色法联合检测内皮细胞 (endothelial cells, EC). SP 免疫组化法取培养至第 4 代的细胞, 按试剂盒 (福州迈新生物技术开发公司) 说明进行操作.

## 1.4 Real-time PCR 检测 Shh 在 EC 上的表达

选取 3 ~ 5 代的 EC, 常规传代以细胞密度约  $1.0 \times 10^7$  孔接种于 6 孔培养板中, 每孔加入细胞悬液 1 mL, 移入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养 24 h. 在细胞生长至铺满 80% 孔底后, 提取 RNA 进行 Real-time PCR 检测.

## 1.5 EC 中总 RNA 的提取

EC 中总 RNA 的提取按试剂盒 (美国 BIO-RAD 公司) 说明进行操作.

## 1.6 RT 反应

按照 RT 试剂盒中的说明书操作. 将配制好的 RT 反应液离心数秒混匀, 迅速置于 PCR 反应仪 (美国 BIO-RAD 公司) 中以 65 °C 5 min 后, 42 °C 1 h; 90 °C 5 min 进行反应. 所得模板 cDNA 产物

小管分装, 于 -80 °C 冰箱保存待用.

## 1.7 Real-time PCR

引物序列 (上海生工生物工程技术有限公司) 如下: Shh (扩增片段长度 162bp) F: 5'-TCC AGA AAC TCC GAG CGA TTT AAG-3', R: 5'-C - AC TCC TGG CCA CTG GTT CA-3'. GAPDH (扩增片段长度 138bp) F: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGA AC-3', R: 5'- TGGTGAAGAC GCCAGTGGGA-3'. 在无菌的 Eppendorf 管中按照说明书表格中的体积将配制好的 Real-time PCR 反应液 (总体积为 20 μL) 离心数秒混匀后迅速置入 PCR 反应仪中, 设置反应条件: 94 °C 3 min, 94 °C 10 s, 60 °C 15 s × 39 circles, 72 °C 20 s, 读板, 溶解曲线分析: 65 °C ~ 98 °C, 0.3 °C/read, 1 s hold. 反应完毕后 4 °C 保存. 每次 PCR 反应均以增生性瘢痕组织成纤维细胞为阳性对照, DEPC 水为阴性对照.

## 1.8 统计学处理

采用 SPSS 统计软件作统计学分析, 实验数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较各组间是否有统计学意义, 以  $P=0.05$  为检测水准.

## 2 结果

### 2.1 EC 的形态

血管瘤组织块接种后 48 ~ 72 h 有细胞长出, 其中 HEC 呈多角形, 边界清, 胞质丰富, 胞核圆形或椭圆形, 居中. 约 2 周时可见内皮细胞岛. 刮除组织块后, 继续培养, 细胞岛增大. 约 4 周时可见细胞长满瓶底呈典型的“鹅卵石”形态, 细胞呈单层生长. 脐静脉内皮细胞于消化后换液 2 ~ 3 次后呈“鹅卵石”样形态.

### 2.2 EC 中第八因子相关抗原的表达

免疫组化 SP 法检测可见 HEC 胞浆中弥散分布棕黄色颗粒, 细胞 VIII 因子呈阳性.

### 2.3 总 RNA 的提取

提取的 RNA 经紫外分光光度计检测其纯度, A260/A280 比值在 1.8 ~ 2.0 之间, 标本总 RNA 浓度为 0.15 ~ 0.45 μg/μL.

### 2.4 Shh 相对拷贝数的测定

读取待测样本中 Shh cDNA 和 GAPDH cDNA 的 Ct 值, 分别将其与预先随机设定的标本标准值进行校对后 (本实验标准值分别设定为:  $CT_{Shh} = 27$ ,  $CT_{GAPDH} = 23$ ), 根据公式计算目的基因含量, 以此对样本中 Shh cDNA 和 GAPDH cDNA 含量进行定量, 比较 HEC 与 HUVEC 中 Shh 基因含量的差异.

$$\text{目的基因含量} = \frac{\text{标准样本绝对拷贝数} \times 2.1017^{27-\text{CTShh 测}}}{2.2122^{23-\text{CTGAPDH 测}}}$$

注：根据回归直线得出，标准样本 Shh cDNA 绝对拷贝数为 53 186.33，内对照 GAPDH cDNA 绝对拷贝数为 96 116.95，实验结果显示，HEC 和 HUVEC 中 Shh cDNA 含量分别为  $(1.233 \pm 1.039) \times 10^5$ 、 $(0.007 \pm 0.021) \times 10^3$ ，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

Shh 属于 Hh 信号家族，对多种器官的形态发生分化起重要作用，其活性信号分子可分泌至细胞外，不仅影响紧邻分泌细胞的靶细胞的基因表达，而且还影响距离较远的靶细胞的基因表达，具有短距离和长距离信号传递功能<sup>[1]</sup>。Hh 信号在血管发生（内皮细胞形成新生血管）和血管生成（血管的改造成型）中起重要作用，其中 Shh 信号与血管发育密切相关<sup>[2]</sup>。它可直接作用于内皮细胞或刺激血管支持细胞产生血管生长因子。Hh 信号通过血管生长因子调节血管的稳定性。Shh 蛋白调节体外小鼠成纤维细胞对血管生长因子、VEGF-A，Ang1 和 Ang2 及 bFGF 的表达<sup>[3]</sup>，Shh 可以诱导斑马鱼胚胎血管源性生长因子的 VEGF 成员的表达<sup>[4]</sup>。Shh 通过诱导周围组织 VEGF 表达直接促进动脉形成并生长<sup>[5]</sup>。Shh 的丧失可导致妊娠后期原始血管网的稳定性降低<sup>[6-7]</sup>。Hh 信号在成长的胚胎器官血管生成的级联过程中起中枢作用，而这种胚胎器官血管生成与肿瘤的血管生成相似<sup>[8]</sup>。

Hh 信号控制血管生成事件的一系列级联过程。Shh 最受关注的作用之一是对动-静脉血管形成的影响。成年兔角膜中加入 Shh 能够诱导动-静脉短路形成，表明正常的动-静脉定向分化受到干扰<sup>[8]</sup>。

Kanda S 等<sup>[9]</sup>认为 Shh 不能诱导内皮细胞的增殖和迁移，但可通过快速激活 PI3-激酶通道和转录调节途径来诱导内皮细胞生成毛细血管，应用 Hh 通路阻滞剂可抑制这种血管生成作用。Pola 等<sup>[9]</sup>发现，与 VEGF 比较，Shh 诱导的新生血管不仅毛细管数量和密度增加，且血管管腔也明显增大。Shh 与血管瘤、血管畸形关系的相关报道极为罕见。

基于以上考虑，笔者在研究中采用实时荧光定量 PCR 观察 HEC 和 HUVEC 中 Shh cDNA 的表达量。本实验根据引物设计原则及 GeneBank 的编码序列设计出特异的 Shh 引物序列，实时荧光定量 PCR 进行定量时采用 GAPDH (House keeping

gene) 作为参比基因对所有样品进行归一化处理，然后再对不同样品之间的目的基因表达量进行比较。解析时采用双标准曲线的定量方法（含有目的基因的瘢痕成纤维细胞作标准曲线）。结果显示，Shh 在 HEC 中的表达高于 HUVEC 中的表达 ( $P < 0.05$ )。

血管瘤是一种血管过度增生的良性肿瘤。本实验对未作干预的 HEC 和 HUVEC 定量检测结果显示，Shh 在 HEC 中的表达高于 HUVEC 中的表达 ( $P < 0.05$ )，提示 Shh 在血管瘤形成中可能具有更为重要的作用，与 Byrd<sup>[1]</sup>及 Pola<sup>[9]</sup>的结论有相同之处。在分子生物学水平，Shh 基因将可能作为区分血管瘤和血管畸形的一项指标。结合本实验结果，考虑如若通过基因水平如各种因子抑制剂或拮抗剂来抑制或拮抗 Shh 的表达，在临床上既可以达到治疗血管瘤的目的，同时还不产生明显的毒副作用，这将是未来生物治疗的共有趋势。在 mRNA 翻译成蛋白质的过程中，尚存在一些影响蛋白表达的修饰环节，Shh 在血管瘤内皮细胞中表达量的增减是否与血管瘤各期有明确的相关性，对于从根本上明确 Shh 基因在血管瘤形成中的具体作用至关重要，尚待下一步的研究。

### [参考文献]

- [1] BYRD N, GRABEL L. Hedgehog signaling in murine vasculogenesis and angiogenesis[J]. Trends Cardiovasc Med, 2004, 14 (8): 308 - 313.
- [2] MINKE VAN TUYL, FREEK GROENMAN, JINXIA WANG, et al. Angiogenic factors stimulate tubular branching morphogenesis of sonic hedgehog-deficient lungs [J]. Developmental Biology, 2007, 303(2): 514 - 526.
- [3] POLA R, LING L, SILVER M L, et al. The morphogen sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors [J]. Nat Med, 2001, 7 (6): 706 - 711.
- [4] LAWSON N D, VOGEL A M, WEINSTEIN B M. Sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the notch pathway during arterial endothelial differentiation[J]. Dev Cell, 2002, 3(1): 127 - 136.
- [5] DYER M A, FARRINGTON S M, MOHN D, et al. Indian hedgehog activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neurectodermal cell fate in the mouse embryo[J]. Development, 2001, 128(10): 1 717 - 1 730.

(下转第 26 页)