



人大肠癌鸡胚尿囊膜移植模型的建立 及血管生成特征的观察

于文静¹, 赵静¹, 连波², 位晓丹¹, 谢斌¹, 高志芹³

(1. 潍坊医学院细胞生物学教研室, 潍坊 261053; 2. 潍坊医学院生物技术实验室, 潍坊 261053;
3. 潍坊医学院药学与生物科学学院, 潍坊 261053)

【摘要】 目的 研究人大肠癌腺癌细胞株 HT-29 鸡胚尿囊膜移植模型建立的方法, 观察和分析其血管生成的特征。方法 将不同浓度的人大肠癌腺癌细胞株 HT-29 接种于鸡胚尿囊膜 (chick embryo chorioallantoic membrane, CAM), 观察影响大肠癌鸡胚移植模型瘤体成活的因素、瘤体生长特征和血管生成情况。结果 建立了人大肠癌 CAM 移植模型。移植模型瘤体易于生长, 具有较强的血管生成作用。结论 该模型易于复制, 能动态观察大肠癌的血管生成过程, 可用于大肠癌的生物行为、药物筛选等领域的研究。

【关键词】 大肠癌; 鸡胚尿囊膜; 模型, 动物; 血管生成

【中图分类号】 R737.31; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)03-0032-04
doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.003.007

Establishment of a Human Colorectal Cancer Model on the Chick Embryo Chorioallantoic Membrane

YU Wen-jing¹, ZHAO Jing¹, LIAN Bo², WEI Xiao-dan¹, XIE Bin¹, GAO Zhi-qin³

(1. Department of Cell biology, weifang medical college, Weifang 261053, China; 2. Biotechnology laboratory, weifang medical college, Weifang 261053, China; 3. Pharmacy and biological science college, Weifang medical college, Weifang 261053, China)

【Abstract】 Objective To establish a human colorectal cancer model on the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) and study its characteristics of angiogenesis. **Methods** Human colorectal cancer cell line HT-29 at different concentrations were inoculated on the CAMs. To observe the factors affecting the survival of the transplanted human colorectal cancer, growth characteristics of the transplanting tumor and the characteristics of angiogenesis. **Results** The transplantation tumor model of human colorectal cancer in CAM was successfully established. It was found that transplantation tumor was easy to grow and it showed strong angiogenesis effects. **Conclusions** It is feasible to establish a transplantation tumor model of human colorectal cancer on CAM. The model can be easily duplicated, which provides a useful animal model for studying the angiogenesis and biological properties of colorectal cancer and can be used in the research of the drug selection for human colorectal cancer.

【Key words】 Colorectal cancer; Chicken embryo chorioallantoic membrane; Model, animal; Angiogenesis

大肠癌是最常见的消化系统恶性肿瘤之一, 病因尚未明确, 但其生长、转移和预后与肿瘤新生血

[作者简介] 于文静 (1979 -), 女, 讲师, 硕士, 研究方向: 肿瘤分子生物学, E-mail: ywiiwf@163.com。

[通讯作者] 高志芹 (1964 -), 女, 教授, 研究方向: 肿瘤分子生物学, E-mail: zhiqingao@wfmc.edu.cn。

管生成密切相关,因此,抗肿瘤血管生成成为治疗大肠癌很有希望的途径之一,肿瘤血管生成和抗血管生成治疗的研究前提是建立适合的大肠癌血管生成模型。本研究选用人大肠癌腺癌细胞株 HT-29 建立鸡胚尿囊膜(CAM)移植模型,并观察其建模后肿瘤血管生成特征。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 人大肠癌腺癌细胞株 HT-29,购自中国协和医科大学肿瘤医院肿瘤研究所。

1.1.2 实验试剂 RPMI 1640 培养液:solarbio 公司生产;灭菌级无支原体新生牛血清:杭州四季青生物工程材料公司;胰蛋白酶:solarbio 公司。

1.1.3 种蛋 购自潍坊市第五养鸡场。

1.2 实验方法

1.2.1 肿瘤细胞培养 HT-29 细胞生长于含 10% 灭活新生牛血清的 RPMI 1640 培养基,培养箱中常规培养。

1.2.2 鸡胚孵育 种蛋常规消毒后,气室端向上,置于温度 37.6℃,湿度 66% 的恒温恒湿培养箱孵育,每天转蛋一次。自制照蛋器验蛋,距离胎头下方 0.5~1.0 cm 处划定开窗位置,备用。

1.2.3 CAM 开窗法 将发育良好的 8 日龄鸡胚置于超净台消毒,用无菌眼科镊在鸡胚气室端开小孔并穿透壳膜,以验蛋划定的开窗位置为中心开 1 cm × 1 cm 的窗,使用无菌注射器加 1 滴生理盐水湿润卵壳膜后刺破壳膜,使 CAM 下塌与卵壳膜分离,去除卵壳膜后暴露 CAM,制成假气室,用无菌透明胶带封窗备用。

1.2.4 肿瘤细胞接种及实验分组 取指数生长期的 HT-29 细胞,用 0.25% 的胰酶消化,以 1000 r/min 离心 5 min,用 0.1 mol/L PBS 调整细胞数量。取 20 μL 细胞悬液,加于鸡胚 CAM 大血管间相对无血管区域,分为 6 个组:PBS、 1×10^6 、 2×10^6 、 4×10^6 、 8×10^6 、 1.6×10^7 ;PBS 组作为阴性对照,每组 9 只鸡胚。加入细胞后,用无菌透明胶带封口,置于恒温恒湿培养箱继续孵育,不再转蛋。

1.2.5 固定取膜 接种后每天观察鸡胚存活情况及移植瘤生长情况,以胚胎活动状况判断鸡胚存活,以肉眼观察直径达 2 mm 的实体瘤为成瘤阳性;自完成接种后每天从各组取胚,对 CAM 行原位数码相机拍照,再以 1:1 的甲醇和丙酮混合液固定 10 min,

用眼科剪剪下实验区的 CAM,平铺于平皿中数码相机拍照,用计算机图形分析系统处理图像;部分标本以中性福尔马林原位固定 10~15 min,常规石蜡包埋、切片、行组织学检查(HE 染色)。

1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 版统计软件包,运用 χ^2 检验对数据进行统计学处理。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 接种细胞数量对鸡胚存活率和移植瘤成瘤率的影响

本实验将 5 个不同数量的 HT-29 细胞接种于鸡胚尿囊膜相对无血管区,接种后继续孵育 7 d,结果显示接种不同数量的 HT-29 细胞,对鸡胚的存活无明显影响,各实验组鸡胚存活良好, 1.6×10^7 组存活率略低,接种不同数量的细胞对鸡胚的存活率影响的差异无统计学意义($P > 0.05$)(见表 1)。

表 1 在 CAM 上接种不同数量 HT-29 细胞后鸡胚的存活率

Tab.1 Effects of the concentrations of the tumor cells HT-29 on the embryo survival rate

组别 Group	实验鸡胚数 The number of chicken embryo	存活鸡胚数 The number of survival chicken embryo	存活率(%) The survival rate (%)
PBS	9	9	100
1×10^6	9	9	100
2×10^6	9	8	89
4×10^6	9	9	100
8×10^6	9	9	100
1.6×10^7	9	7	78

当接种细胞数低于 4×10^6 时,几乎不能成瘤; 1×10^6 、 2×10^6 组成瘤率分别为 0 和 25%,与 PBS 对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);随着接种 HT-29 细胞数的增加,成瘤率也相应增加,HT-29 细胞数目增加至 1.6×10^7 时,移植瘤成瘤率增加至 100%,与 2×10^6 组比较,差异有显著统计学意义($P < 0.05$),但与接种细胞数在 8×10^6 时的成瘤率相比差异没有统计学意义($P > 0.05$)。(见表 2)

2.2 移植瘤原位生长特性

接种 HT-29 细胞 24 h 后,可见种植的 HT-29 细胞呈淡白色贴附于鸡胚尿囊膜接种区域;48 h 后可见接种区域 HT-29 细胞聚集,CAM 透明度略有降低;72 h 后发现瘤体,其生长速度显著加快,体积增加明显,有明显的血管生成并长入接种区;96 h 后

可见瘤体周围血管呈放射性生长,瘤体进入生长高峰期,体积显著增加,直径可达 5~7 mm;第 7 天以后瘤体增加速度变缓,第 8 天伴随尿囊膜血管网的衰退,瘤体生长开始呈现衰退,瘤体体积未见明显变化。

表 2 在 CAM 上接种不同数量 HT-29 细胞的成瘤率

Tab. 2 Effects of the concentrations of the formation rate of the transplantation tumor

组别 Group	存活鸡胚数 The number of survival chicken embryo	成瘤鸡胚数 The number of tumor formational chicken embryo	成瘤率 (%) The tumor formation rate
PBS	9	0	0
1×10^6	9	0	0
2×10^6	8	2	25
4×10^6	9	3	33
8×10^6	9	8	89
1.6×10^7	7	7	100* [△]

注: * 与 2×10^6 组相比, $P < 0.05$; [△] 与 8×10^6 组相比, $P > 0.05$

Note: * Compared with 2×10^6 group, $P < 0.05$; [△] Compared with 8×10^6 group, $P > 0.05$

2.3 大肠癌移植模型血管生成特征

接种 HT-29 细胞 24 h 内,除 CAM 血管网正常发育外,未见明显血管变化;48 h 后可见较弱的血管反应,部分鸡胚可见少量较细的血管向接种区生长;接种 HT-29 细胞 72 h 后,CAM 上血管明显增粗、增多,排列紊乱,可观察到 CAM 上血管向瘤体集中,部分长入瘤体;第 4 天可见血管以新生瘤体为中心放射状排布,部分血管粗大、盘曲。第 5 天时进入生长高峰,与第 1 天比较血管数目差异显著;以后每天血管数目都在增加,至第 8 天,伴随着尿囊膜血管网的衰退,以瘤体为中心选定范围内的血管数目有明显下降。(彩插 3 图 1,2)

2.4 大肠癌鸡胚尿囊膜移植模型的组织细胞学特征

常规石蜡切片、HE 染色,光镜下可见模型瘤体组织细胞结构与人大肠癌腺癌组织标本结构相似。肿瘤细胞多呈圆形或椭圆形,体积大,可见瘤巨细胞,细胞胞浆少,核大深染,异型性明显,核分裂相常见。部分肿瘤细胞形成腺管样组织。瘤体周围可见新生血管及淋巴管(彩插 3 图 3)。

3 讨论

肿瘤血管生成及抗血管生成研究中有多种体内、体外模型被广泛应用,体外模型由于缺乏肿瘤生长及其血管环境的模拟,往往需要结合适当的体

内模型。CAM 移植瘤模型是应用较广泛的体内研究模型^[1,2],本研究将人大肠癌腺癌细胞株 HT-29 接种到 CAM 上,摸索 HT-29 的建模条件,成功建立大肠癌腺癌 CAM 移植瘤模型,从蛋壳开窗处可观察到移植模型瘤体的生长过程及血管生成特征,效果直观。且实验过程中对仪器设备条件要求不高,实验周期短,故 CAM 是研究肿瘤血管生成及抗血管生成抑制剂的良好动物模型,可应用于大肠癌腺癌的血管生成及抗血管生成治疗研究。

但不同的肿瘤类型、不同肿瘤细胞株在 CAM 移植瘤模型建立过程中的条件和成功率均有不同。其成功率受开窗方法、载体选择、开窗时间、细胞接种数量/密度等很多因素的影响^[3],在模型建立之前应综合考虑各方面因素,以保证实验的成功率。本研究中 HT-29 细胞在培养中呈岛样生长,增殖活跃,细胞的接种数量对移植瘤模型成瘤率有明显影响。但应同时考虑接种细胞数量实验鸡胚的成活率及实验的可操作性的影响,成瘤率达 100% 的 1.6×10^7 组,在批量建模时会增加细胞培养的工作量和难度。模型应用时所选择的合适的肿瘤细胞数量级应综合考虑成活率、成瘤率及实验的可操作性,既可保证较高的成瘤率,又不至于因癌细胞数量太大而增加实验负担,依本实验结果显示 8×10^6 为 HT-29 细胞 CAM 移植模型的理想接种数量。

有研究发现接种时所选择的鸡胚日龄也对模型建立的成功率存在影响^[4],实验中观察发现过小的鸡胚如还处于“单珠期”,胚胎的活动度较大,接种点很难固定,常常会转移位置,对实验效果及观察有很大影响,且胚龄小时对实验环境温度的要求较高,开窗后死亡率也较高。随胚龄增长,鸡胚开窗后的成活率会明显增加,但鸡胚胚龄太大时其在蛋壳内所占空间较大,CAM 也开始出现退化,且鸡胚孵育周期只有 21 d,对建模后的应用限制较大,故不宜过晚接种。综合鸡胚发育状态、血管形成特征及实验目的需求等多种因素,HT-29 细胞 CAM 接种的理想胚龄为第 7~9 天。此外,建模成功的实验中心菌操作也很关键,有学者建议滴加含抗生素的液体预防感染。但若能保证严格的无菌操作可以保证实验的成功率,还可避免预防性滴加的抗生素对细胞生长和后期药物干预的影响。

实验中观察到,血管反应先于移植模型瘤体的生长,符合 Folkman^[5,6]的肿瘤血管新生理论,瘤体生长过程在一定程度上依赖于新生血管输送营养,

出现明显血管反应后,肿瘤新生的血管保证了瘤体生长的高峰期,伴随 CAM 的血管生成衰退,肿瘤血管生成也会出现衰退,且瘤体生长停止。CAM 移植模型的主要缺陷也在于其建模后最长 14 d 的可观察的实验周期。但作为体内实验模型,取自人结肠癌腺癌的细胞株 HT-29 的 CAM 移植模型瘤体经常规固定、石蜡切片、HE 染色结果显示很好的保留了大肠癌腺癌的组织细胞学特征,增加了对其生物学行为干预研究的可信度。

将 HT-29 细胞直接种到鸡胚尿囊膜上建立移植模型,可用于研究大肠癌生长特性、血管生成、侵袭、转移以及肿瘤化疗药物筛选和放射敏感性等多种研究^[7,8],尤其适用于肿瘤血管生成因子及药物的筛选及研究,为大肠癌抗血管生成治疗研究提供一个良好的模型。

参考文献:

- [1] Ribatti D, Vacca A, Roncali L, et al. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis[J]. *Int J Dev Biol*, 1996, 40: 1189 - 1197.
- [2] Tufan AC, Satiroglu-Tufan, NL. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model system for the study of tumor angiogenesis, invasion and development of anti-angiogenic agents [J]. *Current Cancer Drug Targets*, 2005, 5(4): 249 - 266.
- [3] Sergio UD, Rachel E. A model system for testing gene vectors using murine tumor cells on the chorioallantoic membrane of the chick embryo[J]. *GenetMol Res*, 2002, 1 (2) : 167 - 175.
- [4] Jianping Wang, Lihong Wang, Lin Cai. Establishment of a transplantation tumor model of human osteosarcoma in chick embryo [J]. *Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, 2009, 8(9):531 - 536.
- [5] 胥明,蒋海飏,王兴鹏. 人胰腺癌鸡胚模型的建立及其肿瘤生物学观察[J]. *消化外科*, 2005, 3 (2): 101 - 104.
- [6] 班立丽,李玛琳,张慧等. 人肝癌鸡胚尿囊膜移植瘤及其血管生成模型的建立[J]. *肝胆外科杂志*, 2009, 17 (3): 229 - 231.
- [7] Walter JM, Mark LK, Angela P, et al. A novel technique for quantifying changes in vascular density endothelial cell proliferation and protein expression in response to modulators of angiogenesis using the chick chorioallantoic membrane (CAM) assay[J]. *Journal of translational medicine*, 2004, 2: 4.
- [8] Li YJ, Wang D, Zhou Y. Observation of the microstructure and ultrastructure of microvessels induced by OS-732 cell line[J]. *J First Mil Med Univ (Chinese)*, 2002, 22: 127 - 129.

[修回日期]2011-12-14