

肉瘤 S180 鸡胚尿囊膜移植瘤模型建立及生物学特性研究

袁野¹, 赵凤丽¹, 孙婷婷¹, 朱冠华², 朱雷¹, 李吉萍^{1*}

(1. 扬州大学 药理教研室, 江苏 扬州 225001; 2. 上海市第一人民医院 药剂科, 上海 200080)

[摘要] 目的: 建立肉瘤 S180 鸡胚尿囊膜(CAM)移植瘤模型, 研究其形态学及生物学特性。方法: 在无菌条件下将肉瘤 S180 肿瘤细胞接种于 CAM 上, 观察影响肉瘤 S180 移植瘤成活的因素、移植瘤生长特性、生物学性状和形态学特征。结果: 建立了肉瘤 S180 CAM 移植瘤模型。移植瘤易于生长, 成瘤率较高, 具有较强的血管生成诱导作用。当接种肉瘤 S180 肿瘤细胞为 5×10^7 个/枚时, 成瘤率达到 83.33%, 且与第 1 天比较, 诱导血管数从第 2 天开始就呈统计学差异 $P < 0.05$, 当移植第 4 天时呈极显著性差异 $P < 0.001$ 。结论: 该模型具有易于复制、操作简单、适用范围广等特点, 可应用于肿瘤血管生成的生物学行为研究, 为抗血管生成抗肿瘤药物的筛选提供了更为直观的平台。

[关键词] 肉瘤 S180; 鸡胚尿囊膜(CAM); 移植瘤; 成瘤率

[中图分类号] R73-35 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0221-05

Establishment of Sarcoma S180 Model on Chick Embryo Chorioallantoic Membrane and Its Biological Properties

YUAN Ye¹, ZHAO Feng-li¹, SUN Ting-ting¹, ZHU Guan-hua², ZHU Lei¹, LI Ji-ping^{1*}

(1. Department of Pharmacology, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China;

2. Department of Pharmacy, Shanghai First People's Hospital, Shanghai 200080, China)

[Abstract] **Objective:** To establish S180 sarcoma model on the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) and to study its morphological and biological properties. **Method:** S180 cell was cultivated and implanted on the CAMs under sterile conditions. The factors affecting the implanted tumors and the morphological and biological properties of the tumors were studied. **Result:** S180 sarcoma model on the CAM was established. The implanted tumor was easy to grow on the CAM, and had a strong tendency of angiogenesis. When the number of inoculated tumor cells reached 5×10^7 in each egg, the tumor rate could reach 83.33%. Compared with the first day, the number of induced vessels on the second day was significantly different ($P < 0.05$). On the fourth day after transplant it was greatly increased ($P < 0.001$). **Conclusion:** Our findings suggest that this model is of easy duplication and simple operation, and can be widely used in the research of the biological properties for tumor angiogenesis and it provides an intuitive platform for the drug screening of anti-angiogenic.

[Key words] S180; chick chorioallantoic membrane; implanted tumor; tumor formation rate

鸡胚尿囊膜 (chick chorioallantoic membrane,

CAM)^[1] 是鸡胚发育过程中的一个呼吸器官, 它随着胚龄的增加而增大, 毛细血管极其丰富。因其具有此特性, 所以 CAM 常作为血管生长研究的观测部位。早在 1952 年 Karnofsky^[2] 就首次把肿瘤细胞和组织移植到鸡胚上用于评价肿瘤生长的各种参数。近年来该模型得到了进一步拓展, 并将其应用于抗肿瘤药物的筛选。目前研究的 CAM 移植瘤模型, 主要有肺癌 A549^[3]、膀胱癌^[4]、结肠癌^[5] 等。但由于

[收稿日期] 20101227(008)

[第一作者] 袁野, 硕士研究生, 从事中药药理新药研究与开发研究, Tel: 15195555725, E-mail: yuanye2008@126.com

[通讯作者] * 李吉萍, 硕士, 香港大学访问学者, 副教授, 硕士研究生导师, 从事中药药理新药研究与开发研究, Tel: 13815833998, E-mail: jipingli2005@126.com

受到接种成瘤率、鸡胚死亡率、移植瘤体积和移植瘤生长周期等因素的影响,还没有一种模型可以被广泛的认可和运用。为此,笔者选取在动物实体瘤移植中成瘤率较高的肉瘤 S180 作为 CAM 移植对象,希望能建立一个全新的 CAM 移植瘤模型。

1 材料

1.1 动物与细胞系 SPF 级 ICR 小鼠和受精种蛋由扬州大学比较医学中心提供,生产许可证号 SCXK(苏)2002-0009,使用许可证号 SYXK(苏)2002-0045;肉瘤 S180,购自南京凯基生物科技发展有限公司;肺癌 A549,购自中国科学院上海生物科学细胞资源中心。

1.2 仪器 SW-CJ-1D 超净工作台(苏州净化设备有限公司),细胞培养孵箱(上海精宏实验设备有限公司),LRH-250-S 恒温培养箱(广东医疗器械厂),CKX41 倒置显微镜(Olympus Corporation),XS-212-202 解剖显微镜(JNOEC),COOLPIXs560 数码相机(日本-Nikon)1000 万像素。

1.3 试剂 小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司,批号 080503);RPMI-1640 培养液(Gibco,批号 1291520);胰酶(生工生物工程上海有限公司,批号 2907B503);苯扎溴铵(新洁尔灭,南昌白云药业有限公司批号 090603);95%乙醇、甲醛(分析纯,上海苏懿化学试剂有限公司,批号 070701,090820)。

2 方法

2.1 细胞培养与鸡胚孵育 所购肉瘤 S180 瘤株在标重 ICR 小鼠体内腹水瘤传代 3 次备用。肺癌 A549 细胞在 37℃,相对湿度 100%,5% CO₂,含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液的条件下进行培养,每 2 天换液 1 次。SPF 级受精种蛋选取质量在(50±2)g 种蛋 150 枚,用 0.1% 的新洁尔灭溶液浸泡消毒后放于温度 37℃,湿度为 60% 的恒温恒湿培养箱中孵育。将种蛋钝端向上,呈 45° 倾斜,每天翻动鸡蛋 3 次,孵育 7 d 后备用。

2.2 模型建立与分组 用检蛋灯挑选存活的种蛋,随机分为 7 组,每组 15 枚。人工气室的制作方法按文献[6]进行并适当改进。取传代接种 7 d 后的 S180 腹水瘤小鼠断颈处死,75% 乙醇溶液中消毒 2~3 min 后,无菌条件下抽取腹腔内乳白色肉瘤 S180 瘤液,用 0.01 mol·L⁻¹ PBS 液分别将其调整为每 0.1 mL 所含瘤细胞数量为 5.0×10⁵,5.0×10⁶,5.0×10⁷,5.0×10⁸,5.0×10⁹ 个。与此同时取对数

生长期的肺癌 A549 细胞,0.25% 胰酶消化后,再用 0.01 mol·L⁻¹ PBS 液调细胞密度为 0.1 mL 含 5.0×10⁷ 个。取以上 2 种肿瘤细胞液分别吹打均匀后,用微量加样器吸取 0.1 mL 肿瘤细胞悬液,分别接种至 CAM 相对无血管区,空白组接种 PBS 液。接种后立即用消毒的透明胶带封闭,继续孵育 10 d。观察各组鸡胚存活情况及各组存活鸡胚移植瘤生长情况,存活鸡胚以肿瘤直径 2 mm 为成瘤阳性,分别记录结果。以上操作均在超净工作台上进行。

2.3 肉瘤 S180 CAM 移植瘤生长规律观察 取种蛋 40 枚,CAM 上接种肉瘤 S180 细胞 5.0×10⁷ 个/枚,接种后继续孵育,每 2 天取 5 个成瘤鸡胚观察移植瘤生长情况,拍照,用游标卡尺测出移植瘤长、短径,并按公式^[7]: $V = 1/2(\text{长径} \times \text{短径}^2)$ 计算移植瘤体积,绘制生长曲线。

2.4 肉瘤 S180 CAM 移植瘤及诱导血管生成观察 CAM 移植瘤标本用 4% 多聚甲醛原位固定 15 min,以移植瘤为中心取膜。取出标本平铺于透明的大玻璃片上,于解剖显微镜下观察肿瘤区新生血管的分布及其与周围宿主血管的关系,并计数以组织为中心呈放射状分布在直径 5 mm 范围内的血管数目。计数后标本经 4% 多聚甲醛固定,常规脱水、石蜡包埋、切片,然后进行 HE 染色,观察移植瘤组织内部形态结构。

2.5 数据处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS16.0 统计软件进行单因素方差分析,比较组间差异。率间差异采用 Fisher 精确概率法。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 肉瘤 S180 细胞接种数量与肺癌 A549 对移植瘤成瘤率和鸡胚死亡率的影响 肉瘤 S180 移植瘤成瘤率与肿瘤细胞接种数量成正相关。接种瘤细胞数低于 5.0×10⁷ 个时,成瘤率显著降低,瘤细胞数低于 5.0×10⁵ 个时,难以成瘤。而接种瘤细胞数高于 5.0×10⁷ 个时,易于成瘤。增加接种瘤细胞数成瘤鸡胚相应增加。但接种瘤细胞数量增至 5.0×10⁸ 个时,接种 9 d 后鸡胚死亡率达 40%,当接种细胞数量达 5.0×10⁹ 个时,大部分鸡胚死亡。肉瘤 S180 移植瘤成瘤率与肺癌 A549 组呈显著性差异,尤其是当肉瘤 S180 细胞接种数达 5.0×10⁷ 个时,成瘤率呈极显著性差异。虽然鸡胚死亡率随肉瘤 S180 接种细胞数的增加而增大,但当肉瘤 S180 接种细胞数为 5.0×10⁷ 个时与肺癌 A549 组死亡率相同,见表 1。

表 1 肉瘤 S180 与肺癌 A549 接种细胞数目对鸡胚成瘤率和死亡率的影响

组别	接种细胞数	成瘤鸡胚数	成瘤率	死亡鸡胚数	死亡率
	/个	/只	/%	/只	/%
PBS	0	0/15	0	0/15	0
肺癌 A549	5.0×10^7	2/12	16.67	3/15	20.00
肉瘤 S180	5.0×10^5	2/14	14.29	1/15	6.67
	5.0×10^6	5/13	38.46 ¹⁾	2/15	13.33
	5.0×10^7	10/12	83.33 ^{1,2)}	3/15	20.00 ¹⁾
	5.0×10^8	9/9	100.00 ^{1,2)}	6/15	40.00 ^{1,2)}
	5.0×10^9	5/5	100.00 ^{1,2)}	10/15	66.67 ^{1,2)}

注:与肉瘤 S180 接种细胞 5.0×10^5 个组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与肺癌 A549 组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 肉瘤 S180CAM 移植瘤生长规律观察 肉瘤 S180 细胞接种后开始呈弥散样位于接种区,1 d 后可见瘤细胞贴附于 CAM,长、短径约 1~2 mm,边界较模糊,移植瘤所在 CAM 透明度变低,但色调均匀。第 2 天可见移植瘤中央区域绒毛尿囊膜透明度较周边明显变低,但边界清晰度提高且边界幅度有所扩展,瘤体周围的血管开始增加。4 d 后瘤体长、短径逐渐增大,体积增幅明显,瘤体周围血管继续增加。6 d 后肿瘤体积继续增大,增幅基本达到极值,瘤体周围血管继续增加且血管变粗。8 d 后肿瘤体积继续增大,但增幅变缓;瘤体周围血管数量增幅减小,但血管继续变粗变大,瘤体表现出供血不足,中央可见坏死灶。10 d 时肿瘤体积基本不再增大,瘤体周围血管数量也不再增加,但血管继续增大,供血不足情况严重,坏死灶常见。其瘤体体积增长曲线见图 1,移植瘤形态见图 2。

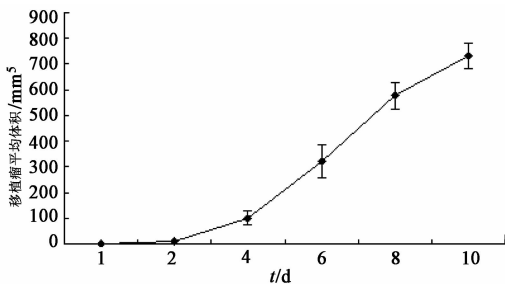
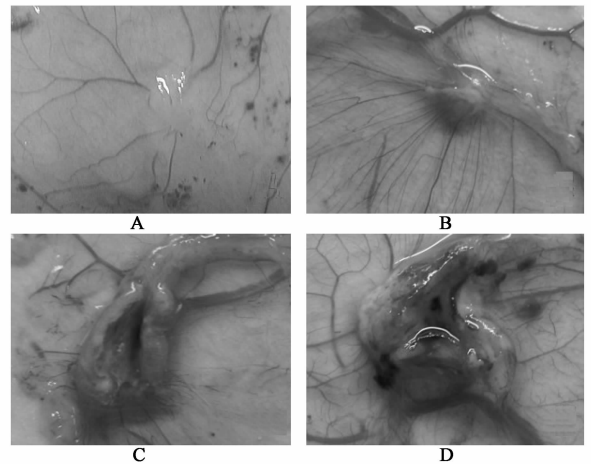


图 1 肉瘤 S180CAM 移植瘤体积增长曲线

3.3 肉瘤 S180 CAM 移植瘤形态结构观察 肉眼观察肉瘤 S180 移植瘤呈肉色,组织四周与 CAM 边界较清晰,表面轻度凹凸不平,瘤组织质脆易碎,切面中心为浅黄色,有的瘤块中心可见坏死灶,见图 2 C,D。光镜下可见移植瘤组织与肉瘤 S180 组织结构相似,细胞大小、形态不规则,分化程度低,有一个或多个大而规则的圆形或椭圆形核,细胞质相对

较少,可见分裂细胞。

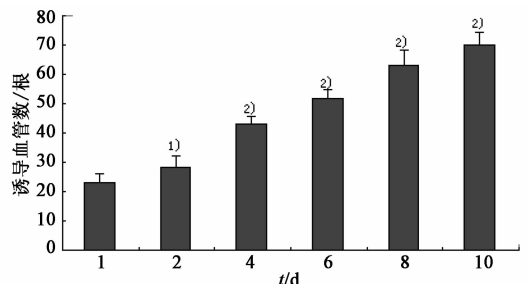


A. 移植后第 1 天;B. 移植后第 4 天;C. 移植后第 8 天;D. 移植后第 10 天

图 2 肉瘤 S180CAM 移植瘤不同生长期形态观察

3.4 肉瘤 S180CAM 移植瘤诱导血管生成作用观察

肉瘤 S180CAM 移植有明显的诱导血管生成作用,从移植瘤基本成型的第 2 天开始,移植瘤诱导血管数就与第 1 天呈统计学差异 $P < 0.05$ 。从第 4 天开始,移植瘤诱导血管数就与第 1 天呈极显著性差异 $P < 0.001$,见图 3。

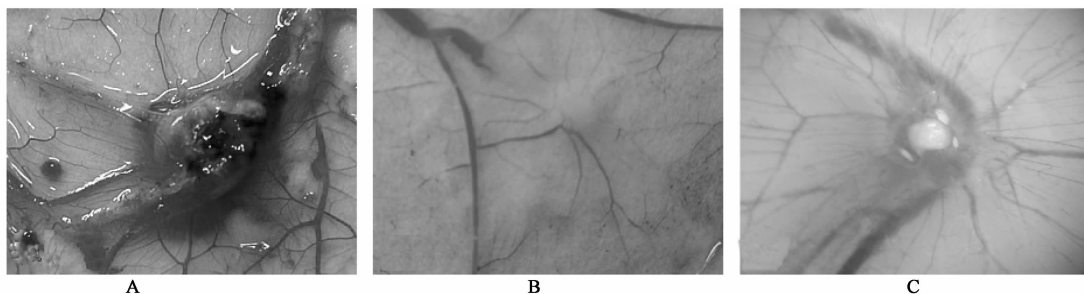


与第 1 天比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.001$

图 3 肉瘤 S180CAM 移植瘤不同生长期诱导血管生成情况观察 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.5 肉瘤 S180 与肺癌 A549 CAM 移植瘤对比 对细胞接种浓度和生长周期相同的肉瘤 S180 和肺癌 A549 进行相关生长特性对比。成瘤率和鸡胚死亡率肉瘤 S180 移植瘤明显优于肺癌 A549 移植瘤。肉

瘤 S180 的成瘤率可达 83.33%，而死亡率为 20%。肺癌 A549 的成瘤率仅为 16.67%，而鸡胚死亡率达 20%。对比移植瘤体积和诱导血管数，肉瘤 S180 比肺癌 A549 也有明显优势。见表 1, 图 4。



A. 肉瘤 S180 移植瘤 9 d 形态; B. 肺癌 A549 移植瘤 9 d 形态; C. 文献中肺癌 A549 移植瘤^[3]

图 4 肉瘤 S180 和肺癌 A549 CAM 移植瘤形态学比较

4 讨论

癌症现在已经成为人类最大的疾病难题, 据世界卫生组织统计 2008 年全球癌症死亡人数将已达到 760 万, 并且死亡人数还在逐年不断上升, 抗癌形式异常严峻。抗肿瘤新生血管生成治疗肿瘤已是当今国际抗肿瘤研究的热点之一^[8]。越来越多的研究者致力于肿瘤新生血管生成抑制剂的寻找。而肿瘤新生血管生成抑制剂的高效获取必须依赖于有效实用的筛选模型。因而建立一种易于复制、操作简单、适用范围广的血管生成抑制筛选模型是目前的发展方向。为此有相关学者研究了 CAM 移植瘤模型。2003 年郑秀海^[9]等就胆管癌 CAM 移植瘤模型进行了研究。但就目前的研究情况而言, 还没有一种 CAM 移植瘤模型可以得到广泛的推广和应用。

本实验研究发现, 肉瘤 S180 细胞具有较强的移植生存能力, 接种细胞数在 5.0×10^8 个/枚时, 存活鸡胚 CAM 几乎都可以成瘤, 但接种细胞数低于 5.0×10^7 个/枚时, 成瘤率较低。因为细胞数量的增长呈指数方式, 受鸡胚 21 天生长周期的限制和接种后细胞生长环境改变的影响, 接种细胞数量太少, 移植瘤难以在一定时间内分裂增殖到一定的大小。但是, 增加接种瘤细胞数量虽然易于成瘤, 却对鸡胚的存活率有很大影响, 接种细胞数为 5.0×10^9 个/枚时, 鸡胚存活率显著降低, 死亡率达 60% 以上。所以肉瘤 S180 CAM 移植瘤的最佳接种细胞数应为 5.0×10^7 个/枚。肉瘤 S180 CAM 移植瘤生长周期可达 10 d, 由于 CAM 在孵育第 18 天即开始退化, 所以 10 天应是最长的实验周期。肉瘤 S180 CAM 移植瘤

体积在实验期内随时间的增加而不断增大。且在实验期内, 肉瘤 S180 CAM 移植瘤表现出很好的血管生成诱导作用, 并且随着移植瘤体积的增大血管数量不断增加, 血管直径亦有增大变粗之势, 但进入实验后期随着移植瘤组织不断增大, 组织仍然出现供血不足, 并有坏死灶出现。

本实验还对比研究了肉瘤 S180 和肺癌 A549 CAM 移植瘤的生长特性。通过研究发现, 不论从移植瘤成瘤率、鸡胚死亡率, 还是从移植瘤体积和诱导血管生成能力等方面对比, 肉瘤 S180 CAM 移植瘤模型都优于肺癌 A549 CAM 移植瘤模型。并且与其他动物模型相比, 该模型还具有方法简单, 易于观察, 实验周期短, 价格低廉等优点^[10]。所以, 我们有理由相信肉瘤 S180 CAM 移植瘤模型将在抗血管生成抗肿瘤研究方面具有广泛的应用前景。

[参考文献]

[1] Stevenson W, Butler G. Dermal strain of vaccinia virus grown on the chorioallantoic membrane of chick embryos: a possible large scale production of a bacteria-free virus [J]. *Lancet*, 1933, 222(5735): 228.
[2] Karnofsky D A, Ridgway L P, Patterson P A. Tumor transplantation to the chick embryo [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1952, 55(2): 313.
[3] Zhang Y, He L, Meng L, et al. Suppression of tumor-induced angiogenesis by taspine isolated from Radix et Rhizoma Leonticis and its mechanism of action in vitro [J]. *Cancer Lett*, 2008, 262(1): 103.
[4] Chin W W, Lau W K, Bhuvanewari R, et al. Chlorin

川芎-白芷药对不同配比不同剂型对 偏头痛动物模型的影响

杨胜^{1*}, 张定堃², 苏柘僮², 徐佳丽², 杨金辉²

(1. 成都医学院, 成都 610083; 2. 成都中医药大学, 成都 611137)

[摘要] 目的: 观察川芎-白芷药对不同配比、不同剂型对偏头痛动物模型的影响。方法: 利用硝酸甘油($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) ip 一次造成大鼠偏头痛模型, sc 利血平($0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 7 d 造成小鼠偏头痛模型, 川芎-白芷药对 $3.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 进行治疗, 对模型动物脑组织中 5-羟色胺(5-HT)、5-羟基吲哚乙酸(5-HIAA)、降钙素基因相关肽(CGRP)含量进行检测。结果: 偏头痛大鼠模型组脑组织中 5-HT 含量($720.44 \pm 92.1 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$), CGRP 含量($618.32 \pm 139.3 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$); 与模型组比较, 川芎-白芷药对不同配比、不同剂型 $3.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 可升高偏头痛大鼠脑组织中 5-HT 48.41% ~ 73.18%, 降低头痛大鼠脑组织中 CGRP 38.02% ~ 50.02% ($P < 0.01$); 与小鼠偏头痛模型组比较, 川芎-白芷药对不同配比、不同剂型 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 可升高偏头痛小鼠脑组织中 5-HT 36.60% ~ 69.52% ($P < 0.05, P < 0.01$)。结论: 川芎-白芷药对不同配比、不同剂型主要是通过影响单胺类递质的释放, 缓解神经源性炎症而改善偏头痛的症状。

[关键词] 川芎; 白芷; 偏头痛模型; 5-羟色胺; 降钙素基因相关肽

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0225-04

Effect of Different Proportion and Different Dosage Forms of Combination of Chuanxiong Rhizoma and Angelicae Dahuricae Radix on Migraine in Animal Models

YANG Sheng^{1*}, ZHANG Ding-kun², SU Zhe-tong², XU Jia-li², YANG Jin-hui²

(1. Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China;

2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of different proportion and different dosage forms of the

[收稿日期] 20101222(004)

[通讯作者] * 杨胜, 硕士, 讲师, 从事中药新制剂开发, 新工艺研究与中药药理学研究, Tel: 028-61800127, E-mail: 3474322@qq.com

e6-polyvinylpyrrolidone as a fluorescent marker for fluorescence diagnosis of human bladder cancer implanted on the chick chorioallantoic membrane model [J]. *Cancer Lett*, 2007, 245(1/2):127.

[5] Demir R, Naschberger L, Demir I, et al. Hypoxia generates a more invasive phenotype of tumour cells: an in vivo experimental setup based on the chorioallantoic membrane [J]. *Pathol Oncol Res*, 2009, 15(3):417.

[6] Kunzi-Rapp K, Genze F, Küfer R, et al. Chorioallantoic membrane assay: vascularized 3-dimensional cell culture system for human prostate cancer cells as an animal substitute model [J]. *J Urol*,

2001, 166(4):1502.

[7] 甄永苏. 抗肿瘤药物研究与开发[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004:724.

[8] Folkman J. Angiogenesis [J]. *Annu Rev Med*, 2006, 57(1):1.

[9] 郑秀海, 王曙光, 倪嘉, 等. 人胆管癌鸡胚移植瘤模型的建立及其生物学特性的研究[J]. *第三军医大学学报*, 2003, 25(9):757.

[10] Leng T, Miller J M, Bilbao K V, et al. The chick chorioallantoic membrane as a model tissue for surgical retinal research and simulation [J]. *Retina*, 2004, 24(3):427. **[责任编辑]** 聂淑琴