DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.09.006
第25卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 9
2003年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2003

文章编号:1000-5404(2003)09-0757-03

论著

人胆管癌鸡胚移植瘤模型的建立及其生物学特性的研究

郑秀海,王曙光,倪 嘉,李 昆,韩本立 (第三军医大学附属西南医院全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院,重庆 400038)

提 要:目的 建立人胆管癌鸡胚移植瘤模型,研究其形态学及生物学特性。方法 将人胆管癌细胞接种于鸡胚尿囊膜,观察影响胆管癌移植瘤成活的因素、移植瘤生长特性、形态学特征和生物学性状。结果 建立了人胆管癌鸡胚移植瘤模型。移植瘤易于生长,具有较强的血管诱导作用。光镜、电镜下移植瘤具有与人胆管癌类似的组织结构。结论 该模型可应用于胆管癌的生物学行为研究、药物筛选等领域,具有模型易于复制、操作简单、适用范围广等特点,是研究胆管癌的较好的动物模型。

关键词:动物模型;胆管肿瘤
中图法分类号:R735.8;R73-35 文献标识码:A

Establishment of a human bile duct carcinoma model on the chick embryo chorioallantoic membrane and study of its biological properties

ZHENG Xiu-hai, WANG Shu-guang, NI Jia, LI Kun, HAN Ben-li (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To establish a human bile duct carcinoma model on the chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) and study its morphological and biological properties. Methods Human bile duct carcinoma cell line QBC939 was cultivated and implanted on the CAMs. The factors affecting the implanted tumors and the morphological and biological properties of the tumors were studied. Results A human bile duct carcinoma model on the CAM was established. The implanted tumors, easy to grow on the CAM, had a strong trend of angiogensis and similar structure as human bile duct carcinoma with microscopic verification. Conclusion Our findings suggest that this model is of easy duplication and simple operation, and can be used in the research of the biological properties and drug selection for human bile duct carcinoma.

Key words: animal model; bile duct carcinoma

胆道恶性肿瘤易于早期转移,手术切除率低,术后易复发,临床疗效差[1]。以往对胆管癌的研究多局限于临床标本采集,或应用免疫缺陷动物肿瘤模型,实验条件相对难以控制,且实验周期长,费用昂贵。本研究应用人胆管癌细胞系 QBC_{939},建立人的胆管癌鸡胚绒毛尿囊膜(Chorioallantoic membrane, CAM)移植瘤模型,并探讨其生物学特性,旨在为胆管癌的诊断和治疗研究提供一个简便实用的手段。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与鸡胚孵育

人胆管癌细胞系 QBC_{939} 为我院王曙光教授建株[2]。在 37 ℃,相对湿度 100%,5% CO_2,含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液的条件下进行培养;每 3~4 d 换液 1 次,0.25% 胰酶每 7~8 d 消化传代 1 次。

胚蛋来源于西南农业大学养鸡场,选择重量大小相仿的纯种华联蛋,碘酒、酒精棉球消毒后置于温度为 36~38 ℃,相对湿度为 60%~80% 的恒温孵箱中孵化,胚头斜向上方,孵育 9 d 后备用。

1.2 肿瘤细胞接种与实验分组

挑选有鸡胚形成的胚蛋,分为 5 组,每组 15 只。人工气室的制作与鸡胚绒毛尿囊膜的准备方法按文献[3]进行并适当改进。收集对数生长期培养的肿瘤细胞,用 0.01 mol/L PBS 稀释液分别将接种肿瘤细胞调整为每 0.1 ml 含 1.0×10^6, 2.0×10^6, 4.0×10^6, 8.0×10^6, 16.0×10^6 个细胞,吹打均匀后,用微量加样器吸取 0.1 ml 细胞悬液,分别接种至绒毛尿囊膜相对无血管区,立即用消毒透明胶带封闭,继续孵育 9 d,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。

1.3 肿瘤生长特性观察

取 4.0×10^7 个/ml 细胞接种后,每日取 5 只成瘤鸡胚观察移植瘤生长情况,拍照,测定瘤体直径及厚度,计算肿瘤体积,绘制生长曲线。

1.4 原位铺片及实体瘤的光镜、电镜观察

CAM 移植瘤标本常规应用 4% 多聚甲醛原位固定 15 min,以移植瘤为中心取膜,部分标本常规石蜡包埋、切片,HE 染色,

作者简介:郑秀海(1969—),男,河南省安阳县人,硕士研究生,主治医师,主要从事肝胆胰肿瘤方面的研究。电话:(023)68754000-73079

收稿日期:2002-01-20;修回日期:2002-07-01

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

光镜观察。部分标本以 2.5% 戊二醛固定，作透射电镜观察。另取部分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。

1.5 统计学处理

Fisher 精确概率法确定率间差异的显著性检验。

2 结果

2.1 细胞接种数量对胆管癌移植瘤成功的影响

移植成功率与肿瘤细胞接种数量成正相关。接种瘤细胞数低于 2.0×10^6 时，成瘤率显著降低，瘤细胞数低于 1.0×10^6 时，难以成瘤。而接种瘤细胞数高于 4.0×10^6 时，易成瘤。增加接种瘤细胞数成瘤鸡胚相应增加，但相差并不显著。接种细胞数量增至 8.0×10^6 个时，在接种 9 d 后鸡胚死亡率可达 40%，与 4.0×10^6 组有非常显著性差异。接种细胞数量 16.0×10^6 个时，大部分鸡胚在接种 9 d 后死亡，见表 1。

表 1 接种肿瘤细胞数目对移植瘤成功率及鸡胚死亡率的影响

Tab 1 Effect of the number of inoculated tumor cells on the formation of tumor on the CAM and chick embryo death rate

Group	Number of tumor cells inoculated (cell/mm^3)	Positive number	Positive rate(%)	Death number	Death rate(%)
1	1.0×10^6	0/15	0	0/15	0.00
2	2.0×10^6	3/14	21.43	1/15	6.67
3	4.0×10^6	13/14	92.86 *	1/15	6.67
4	8.0×10^6	11/11	100 **	6/15	40.00 #
5	16.0×10^6	6/6	100	13/15	86.67 #△

*: $P<0.01$, **: $P<0.01$ *vs* group 2; #: $P<0.01$, ##: $P<0.01$ *vs* group 3; △: $P>0.05$ *vs* group 3

2.2 移植瘤生长特性

大体观察：瘤细胞接种后开始呈弥散样位于接种区，24 h 后可见瘤细胞贴附于鸡胚绒毛尿囊膜，直径 3～4 mm，边界清晰，移植瘤所在绒毛尿囊膜透明度变低，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，但边界无扩展。3 d 后瘤体直径逐渐增大，但肿瘤厚度增加更为明显。第 5 天时有的肿瘤中央可见坏死灶，至第 7 天肿瘤呈球形，直径可达 7 mm，坏死灶常见，7 d 后肿瘤增长缓慢。其生长曲线见图 1。

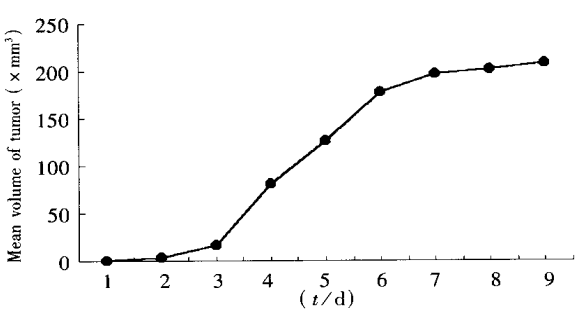


图 1 CAM 移植瘤生长曲线

Fig 1 Growth curve of the transplanted tumor on CAM

2.3 胆管癌对血管生成的诱导作用

移植瘤生长的第 1～2 天，瘤周围未见新生血管长入，鸡胚原有血管也未见有致弯曲现象。第 3 天时可见瘤体周围有大量的宿主血管呈放射状分布，以后血管逐渐变粗。并可见宿主血管向移植瘤弯曲，靠近，见图 2A。第 7 天时移植瘤内可见大量微血管分布，见图 2B。

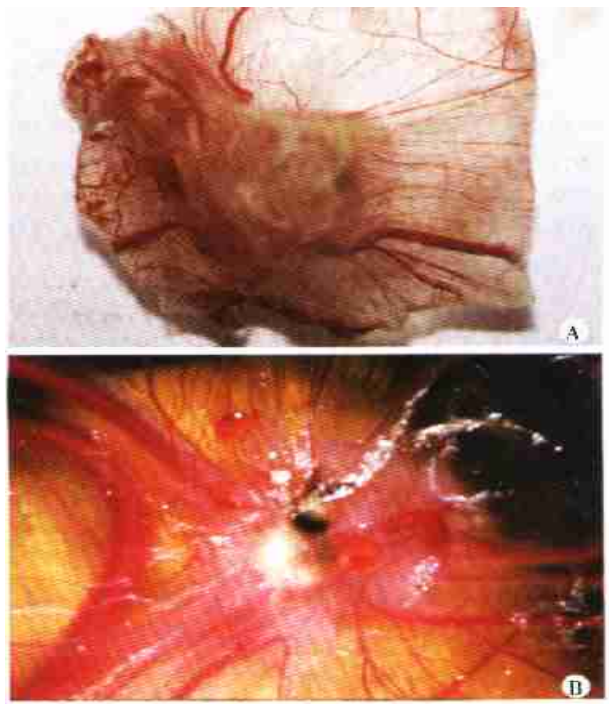


图 2 胆管癌 CAM 移植瘤 A：3 d，B：7 d

Fig 2 Implanted bile duct tumor on CAM A: 3 d, B: 7 d

2.4 移植瘤形态结构

肉眼见移植瘤呈淡红色，四周与 CAM 边界较清晰，表面轻度凹凸不平，瘤组织质脆易碎，切面中心为灰白色，有的瘤块中心可见坏死灶，见图 2B。光镜下可见移植瘤组织与胆管癌组织结构相似，细胞大小、形态不规则，分化程度低，有一个或多个大而不规则的圆形或椭圆形核，细胞质相对较少，可见分裂细胞，见图 3。透射电镜观察：细胞核大，不规则，染色体分布于核膜周边，染色深，可见多核细胞，核仁大、色深；细胞质内有较多的分泌颗粒、微管和微丝，细胞表面可见有细胞连接和微绒毛，细胞间可见有腺腔样结构形成，见图 4。

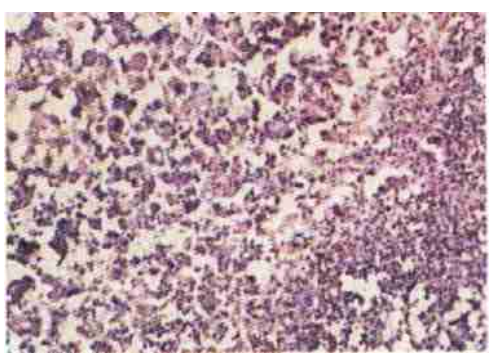


图 3 胆管癌 CAM 移植瘤组织镜下结构 (HE×400)

Fig 3 Structure of implanted bile duct tumor on CAM (HE×400)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

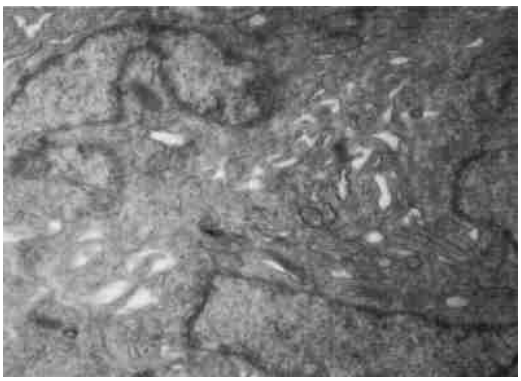


图 4　胆管癌 CAM 移植瘤细胞超微结构　(TEM× 6 000)

Fig 4　Ultrastructure of implanted bile duct tumor on CAM　(TEM× 6 000)

3　讨论

胆管癌细胞具有较强的生存能力, 细胞接种数在 4. 0× 10^6 个以上时, CAM 上接种的移植瘤几乎可以全部形成, 而低于 2. 0× 10^6 个, 成瘤率显著下降。这是因为细胞数量的增长呈指数方式, 受鸡胚生长周期的限制, 接种细胞数量太少, 移植瘤则难以在一定时间内分裂增殖到一定的大小。鸡胚绒毛尿囊膜在孵育第 18 天即开始退化, 对移植瘤的观察与实验应选在该时间点以前[4]。鸡胚所能够提供的营养环境有限, 提高接种细胞数量虽然可使成瘤率增加, 但肿瘤增大后对鸡胚的存活有很大影响, 后期由于肿瘤自身体积增大, 鸡胚环境难以完全满足其营养需求, 造成肿瘤生长趋缓。本研究显示接种胆管癌细胞后移植瘤生长所能达到的最大直径一般在1 cm以下, 最大体积一般在 800 mm^3 以下。

通过肿瘤诱导的新生血管寻找肿瘤的诊断和治疗的新方法, 是近年肿瘤研究的热点之一[5]。鸡胚移植瘤模型是研究肿瘤生物学特性特别是肿瘤诱导血管生成的良好模型[6]。实验表明, 肿瘤组织如果没有血管供应营养, 其最大直径不会超过 2 mm[7], 恶性肿瘤细胞通过诱导宿主血管生成, 为进一步迅速生长提供营养支持。在本研究模型中, 胆管癌细胞接种第3天即可见有大量的宿主血管放射状分布于接种区域周围, 随时间延长, 血管逐渐变粗, 原有接种区域附近宿主血管也可见明显的向肿瘤组织弯曲的现象。提示胆管癌细胞有很强的新生血管诱导作用。在移植瘤组织内可见到丰富的小血管、血窦分布, 这与临床所见的胆管癌标本切片有所不同, 后者常含有更多的纤维结缔组织, 呈乏血管结构。这可能系临床上所见胆管癌多为中晚期胆管癌, 而随着胆管癌的进展, 癌组织内开始有大量的纤维组织增生, 同时微血管密度降低, 其机制尚有待进一步研究。

利用人胆管癌细胞系建立鸡胚移植瘤模型, 国内外尚未见报道。与其他动物模型相比, 该模型具有方法简单, 成瘤率高, 易于观察, 实验周期短, 价格低廉等优点, 可用于胆管癌的生长特性、血管生成、肿瘤化疗药物的筛选及肿瘤的放射敏感性等领域的研究。但是, 由于鸡胚是未成熟的胚胎组织, 其各组织器官代谢功能尚不完善, 使其应用范围受到一定的限制。

参考文献:

[1] 周宁新, 黄志强, 刘永雄. 肝外胆道癌全国调查 1098 例分析[J]. 中华外科杂志, 1990, 28(9): 516

[2] 王曙光, 韩本立, 段恒春, 等. 肝外胆管癌细胞系的建立[J]. 中华实验外科杂志, 1997, 14(2): 67－68

[3] 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(6): 1189－1197

[4] Schlatter P, Konig M F, Karlsson L M, *et al*. Quantitative study of intussusceptive capillary growth in the chorioallantoic membrane (CAM) of the chicken embryo[J]. Microvasc Res, 1997, 54(1): 65－73.

[5] Zogakis T G, Libutti S K. General aspects of anti-angiogenesis and cancer therapy[J]. Expert Opinion Biol Ther, 2001, 1(2): 253－275

[6] Ribatti D, Nico B, Vacca A, *et al*. Chorioallantoic membrane capillary bed: A useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis *in vivo* [J]. Anat Rec, 2001, 264(4): 317－324.

[7] Anderson H, Price P, Blomley M, *et al*. Measuring changes in human tumour vasculature in response to therapy using functional imaging techniques [J]. Br J Cancer, 2001, 85(8): 1085-1093

(编辑　汪勤俭)

(上接 756 页)

3　讨论

方解: 柴胡疏肝解郁, 当归、白芍补血、活血、祛淤; 香附疏肝解郁; 刘寄奴、红花祛淤、止痛; 毛冬青活血、祛瘀。

药理研究证明柴胡有抑菌的作用; 白芍能抑菌并对胃肠道平滑肌有松弛作用; 当归、香附能抑制子宫平滑肌收缩, 故能解痉、止痛; 毛冬青具有舒张血管、改善血循环的作用, 故可改善盆腔淤血及解痉。由此可见, 中药保留灌肠对于慢性盆腔炎、盆腔淤血综合征是行之有效的治疗方法之一。

关键词: 慢性盆腔炎; 盆腔淤血综合征; 逍遥散
中图法分类号: R711. 330. 5　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 黄宗诚, 谷　柯. 盆腔淤血综合征及盆腔疼痛[J]. 实用妇产科杂志, 1998, 14(6): 288

[2] 薛凤霞, 焦书竹. 慢性盆腔炎引起的盆腔疼痛[J]. 实用妇产科杂志, 1998, 14(6): 285

[3] 乐　杰. 妇产科学[M]. 第 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 302－304

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net