DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.08.038

论著

文章编号:1000-5404(2000)08-0954-03

小鼠囊胚与肿瘤细胞共培养时的生长行为观察

后晓南,谭 毅,赵 劼,胡 凯,白 晋,王智彪 (重庆医科大学医学超声工程研究所,重庆 400016)

提 要:目的 观察小鼠囊胚与肿瘤细胞共培养时的生长行为。**方法** 应用胚胎与肿瘤细胞在体外共培养体系,观察小鼠囊胚与肿瘤细胞共培养时生长行为。**结果** 人肺癌细胞株A549对囊胚体外脱带、贴附及扩展的能力无显著性影响。**结论** 在体外小鼠囊胚同人肺癌细胞株A549间的粘附与扩展无明显的种属特异性,并与相作用的细胞的分化水平无关。

关键词:囊胚;肿瘤;共培养

中图法分类号:R392.2;R73-351 **文献标识码**:A

Growth behavior of mouse blastocyst co-cultured with tumor cell line-A549

HOU Xiao-nan, TAN Yi, ZHAO Jie, HU Kai, BAI Jin, WANG Zhi-biao (Institute of Ultrasound Engineering in Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To study the growth behavior of mouse blastocyst co-cultured with a human lung cancer cell line-A549 *in vitro*. **Methods** Mouse embryos were co-cultured with human lung cancer cell-A549 and the growth behavior was observed. **Results** Co-culture with the human lung cancer cell line-A549 did not hinder the preimplantation embryo development to the hatched embryo stage. And the hatched embryo could attach and outgrowth on cancer cell layer *in vitro*. **Conclusion** The attachment and outgrowth of hatched embryo is not species specific and do not depend on cell differentiation.

Key words: blastocyst; tumor; co-culture

从发生学角度来看,肿瘤细胞和胚胎细胞在细胞的增殖、生长和分化等方面都有许多共同特点,尤其是它们都具有惊人的分裂和受原癌基因调控的能力,同时在肿瘤侵袭与胚胎着床过程中也有着近似的侵入方式及相关酶解蛋白分子的参与。所以从胚胎植入的角度来研究肿瘤细胞的侵袭机制将能够更好的理解肿瘤转移的发生与失控。自80年代以来已有许多研究证明人和哺乳动物胚胎与体细胞共培养可以促进胚胎的体外发育和着床,其中肿瘤细胞作为饲养层细胞来提高胚胎卵裂率及囊胚的形成率也是所选择的体细胞之一[1]。本研究将脱带后的囊胚在未经处理的生长旺盛的肿瘤细胞上培养,并观察其贴附、扩展的变化,这在国内外还是首次报道。

本研究旨在建立小鼠囊胚与人肺癌上皮细胞株A549共培养体系,证明小鼠囊胚在肿瘤细胞上贴附与扩展的可能性,从全新的视角观察比较小鼠囊胚与肿瘤细胞相互作用的生物学行为的变化,解释胚胎与肿瘤细胞之间的联系,并探讨发生变化的可能机制。其意义在于可以提供一个体外正常组织侵袭肿瘤细胞的极简明的模型,研究的结果一方面可以补充细胞间相互作用的理论,另一方面可能补充胚胎着床和肿瘤发生的机制,从而进一步促进两门学科的交叉、渗透与发展,对生物学基础理论研究具有重要意义及其应用前景。

基金项目:国家"九五"重点科技攻关项目(96905-02-01)

作者简介:后晓南(1972-),女,江苏省南京市人,博士研究生,主要从事胚胎着床与肿瘤细胞侵袭转移相似性方面的研究。电话:(023)68813317

收稿日期:2000-12-30;**修回日期**:2001-03-29

1 材料和方法

1.1 实验动物

小鼠选取6~8周龄昆白系小鼠,采集胚胎。小鼠由重庆医科大学实验动物中心提供。雌鼠体重20~35 g,雌雄按1:1合笼,自然交配,次日晨发现有阴栓者为妊娠第1天(D_1)孕鼠。

1.2 主要设备和试剂

1.2.1 主要设备 二氧化碳孵箱(Shel-Lab TC2323,美国)、Olympus高级倒置显微镜(IX70,日本)。

1.2.2 试剂 Ham's F_{12}和DMEM培养基(Sigma)、胎牛血清(GIBCO)。

1.3 实验方法

1.3.1 肿瘤细胞的培养 人肺癌细胞株A549由本实验室提供,于共培养前2 d冻融,置于预先放置有盖玻片的6孔板中培养至80%融合后,换无血清培养液培养待实验。

1.3.2 囊胚的获得与种植 取妊娠D_4小鼠于下午3:00~4:00脱颈处死,剪取双侧子宫角,吸取F_{12}:DMEM(1:1)培养液用4号针头从输卵管端冲洗子宫腔。在倒置显微镜下挑选发育良好的囊胚,置于有肿瘤细胞铺底的6孔培养板中共培养。

1.3.3 培养条件 F_{12}:DMEM(1:1),另加20%胎牛血清,pH值7.4,5%CO_2,37 ℃,相对湿度100%。

1.3.4 观察拍照 放置有囊胚的培养板静止24 h后,观察并记录囊胚脱带、贴附、扩展生长情况,并在Olympus高级倒置显微镜下拍照。同时计算培养72 h囊胚的脱带率、贴附率、及滋养层细胞扩展率。

2 结果

2.1 小鼠囊胚与肿瘤细胞共培养体系

在小鼠囊胚与人肺癌细胞株A549共培养体系中,未经任

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

何处理的人上皮来源的 A549 细胞株，在含有 20% FBS 的囊胚培养液中自由生长铺碟，细胞之间紧密相靠、互相衔接，具有连接成片的能力。共培养的囊胚形成晚期囊胚形态饱满，透明，折光度好，基本能够脱带。本实验累计培养小鼠囊胚 59 枚，在共培养 72 h 后的脱带率为 89.8%（53 枚），贴附率为 84.7%（50 枚），扩展率为 74.6%，44 枚。与正常无细胞培养系统的脱带方式及时间无明显差异。结果表明人肺癌细胞株 A549 对囊胚体外脱带、贴附及扩展的能力无显著性影响。

2.2　小鼠囊胚与肿瘤细胞共培养体系中的生物学行为

小鼠囊胚与 A549 共培养 24 h 后，大部分囊胚已经脱带，部分囊胚可以边脱带边进行贴附，透过贴附的囊胚还可以观察到其底层的肿瘤细胞，此时的肿瘤细胞已经基本铺满整个培养板，见图 1。贴附后囊胚边缘的滋养层细胞会在 24 h 内将其下层的肿瘤细胞推开，然后在培养板上进一步贴附和扩展，被推开的肿瘤细胞呈隆起的圆形细胞状，正好围绕在囊胚的周围，从而在囊胚与肿瘤细胞之间形成了明显的界限，而且滋养层细胞边缘的 A549 细胞株还呈现出一定程度的接触抑制，可以观察到有部分肿瘤细胞与囊胚滋养层细胞的接触面有伪足的消失，见图 2；培养的第 4～5 天，可以观察到培养中的滋养层细胞生长形态依旧保持其原有的生长方式与状态，并呈指样突向于肿瘤细胞，见图 3。囊胚的内细胞团开始呈巢式生长，与无细胞培养体系中无明显差别。滋养层细胞周围的肿瘤细胞未能超越滋养层细胞而呈重叠式生长。随着培养时间的延长，囊胚的滋养层细胞的范围继续扩大，直到滋养层细胞充分扩展为止。其扩展的速度最快的时间为培养的第 3 天上午到第 4 天下午，在培养的第 5～7 天滋养层细胞停止扩展，但是与肿瘤细胞的边界依旧清晰，肿瘤细胞仍未能突破两种细胞的界限，而此时培养板其余部位的肿瘤细胞已充分增殖，呈重叠式生长，甚至悬浮生长于培养液中，见图 4。

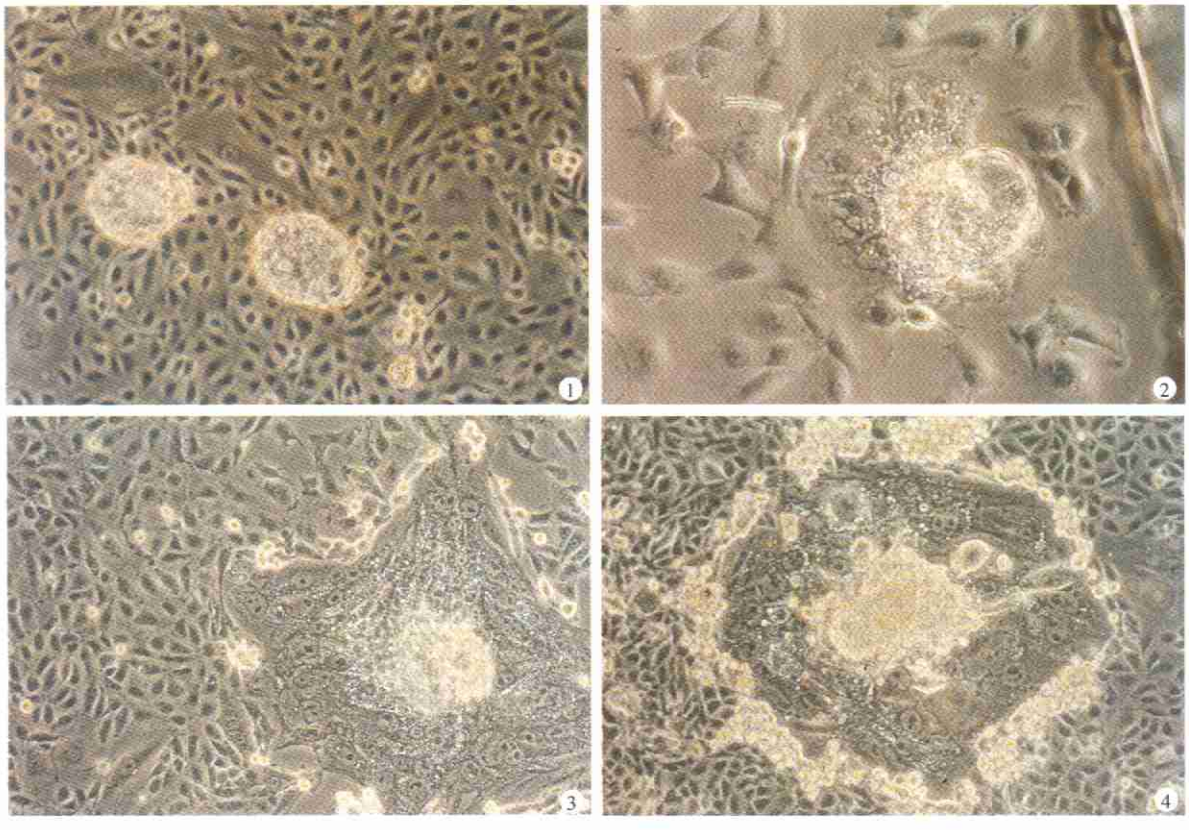


图 1　小鼠囊胚与人肺上皮癌细胞株 A549 共培养 24 h，囊胚已脱带，未贴附，可见下方铺满的肿瘤细胞　（×100）

Fig 1　Mouse blastocyst co-cultured with a human lung cancer cell line-A549 *in vitro* for 24 h　（×100）

图 2　小鼠囊胚与人肺上皮癌细胞株 A549 共培养 2 d，已贴附并扩展的囊胚，可见肿瘤细胞与滋养层细胞的边界的肿瘤细胞的接触抑制　（×200）

Fig 2　Mouse blastocyst co-cultured with a human lung cancer cell line-A549 *in vitro* for 2 d　（×200）

图 3　小鼠囊胚与人肺上皮癌细胞株 A549 共培养 5 d，已扩展的囊胚，并突向于肿瘤细胞　（×100）

Fig 3　Mouse blastocyst co-cultured with a human lung cancer cell line-A549 *in vitro* for 5 d　（×100）

图 4　小鼠囊胚与人肺上皮癌细胞株 A549 共培养 5 d，已扩展的囊胚，可见肿瘤细胞呈重叠式生长，形成明显的边界　（×100）

Fig 4　Mouse blastocyst co-cultured with a human lung cancer cell line-A549 *in vitro* for 5 d　（×100）

3　讨论

由于早期胚胎滋养层细胞的植入与肿瘤的侵润与转移可能有相似的机制，所以肿瘤侵袭与囊胚植入的相似性研究可以作为研究生命起源、胚胎着床、肿瘤发生与肿瘤侵润与转移的突破口。而在体外培养中如何将早期胚胎与肿瘤细胞的生物学行为结合起来，建立两者统一的实验模型将是研究的基础，也是本实验的

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

目的。因此将脱带后的小鼠胚胎与未经处理的肿瘤细胞共培养，使其直接接触是本研究的创新点。

Ishiwata 等[1]将 10 种人类肿瘤细胞株作为饲养层细胞，与着床前各期的受精卵共培养，并比较受精卵的生长发育情况。结果提示，促进囊胚发育最好的细胞株为来源于人类子宫颈的鳞状细胞癌细胞株SKG-Ⅱ。Ben-Chetrit 等[2]应用卵巢上皮癌细胞作为营养细胞，与人胚一起共培养，在受精后第 5 天，共培养组 68% 的囊胚发育到桑葚胚，而对照组仅 34%。这主要是在培养环境中存在某些对胚胎有利的营养因子及促胚胎发育成分[3]，特别是卵巢上皮细胞癌分泌的集落刺激因子，表皮生长因子、转生长因子、血小板衍生生长因子、白细胞介素-1 及人着床前胚胎 EGF-R 等。Goshen 等[4]将绒毛膜癌细胞与人正常的滋养层细胞共培养，发现绒癌细胞吸引滋养层细胞，伸出伪足吞食并形成慢性生长的克隆，在这一过程中，形成了一种杂交细胞，这种细胞与细胞之间的相互作用正是在体滋养层细胞形成胎盘的过程。这些实验都表明将性质不同的细胞共培养的形态学变化是研究细胞内在规律的可能方向之一。

我们所建立的脱带后的囊胚与肿瘤细胞的共培养体系是将欲测细胞共置于统一的生长环境中，旨在了解相互都是动态的具有侵袭能力的不同来源的细胞之间相互作用的方式。重点在于研究两种细胞接触后局部产生的生物学行为的变化。实验中选择人肺癌上皮细胞株 A549 是因为考虑选择胚层来源不同及异种细胞作为实验的对象。通过本实验的初步研究观察发现，脱带后囊胚的贴附与无细胞培养体系相比，无明显时间与形态上的差异。虽然贴附开始是发生在肿瘤细胞的表面，但经过 24 h 的继续培养，囊胚将“植入”进肿瘤细胞的中间，进而推开底层细胞直接贴附并扩展在培养板上。这种现象与小鼠囊胚在小鼠子宫上皮细胞作为饲养层细胞上生长行为相一致[5]。故本实验提示囊胚在除母体子宫内膜外还可能和其他细胞相粘附，并有滋养层细胞的外延生长，说明胚胎与子宫上皮细胞间的贴附同其他细胞间的粘附机制有某些相似性，并且说明小鼠囊胚体外的贴附与扩展与相作用的细胞的分化水平无关。本实验模型的建立使不同细胞间相互作用关系的比较性研究成为可能。

在培养的 4～5 d 以后囊胚的滋养层细胞继续扩展，并全部平铺于培养板上，形成一透明的膜状结构，肿瘤细胞在囊胚的周围形成一隆起的细胞界限。可能的原因是：①肿瘤细胞的粘附性较低，在滋养层细胞运动的作用下，将接触的肿瘤细胞从培养板上推起，而形成隆起的细胞结构。②在滋养层细胞所分泌的基质金属蛋白酶的水解下将肿瘤细胞的粘附性伪足从培养板上消化起来，而形成细胞的界限。③作为具有侵润性的滋养层细胞是否通过某种机制诱导了接触的肿瘤细胞的凋亡？对于共培养体系中肿瘤细胞出现接触抑制的机制将是本实验室下一步研究的重点。

参考文献：

[1] Ishiwata I, Tokieda Y, Ishiwata C, *et al*. Effects of feeder cells (human cancer cell lines) on the development of mouse embryos by co-culture[J]. Hum Cell, 1997, 10(4): 237－246.

[2] Ben-Chetrit A, Jurisicova A, Casper R F. Coculture with ovarian cancer cell enhances human blastocyst formation *in vitro*[J]. Fertil Steril, 1996, 65(3): 664－666.

[3] Kobayashi M, Hirako M, Minato Y, *et al*. Rat hepatoma Reuber H-35 cells produce factors that promote the hatching of mouse embryos cultured *in vitro*[J]. Biol Reprod, 1997, 56(4): 1 041－1 049.

[4] Goshen R, Schreck H, Komitowski D, *et al*. Morphologic characteristics of the interaction between normal cytotrophoblasts and their malignant counterpart in the development of trophoblastic neoplasia[J]. J Soc Gynecol Investig, 1996, 3(4): 209－215.

[5] 郑瑞珍，辛　俭，朱少侠，等. 兔和小鼠早期胚胎 ICM 在 ES 培养系统中行为的比较[J]. 动物学报，2000，46(3)：314－323.

（编辑　王　红）

（上接 953 页）

胰管和胰腺细胞损伤程度不同。本研究结果表明，杂种狗用于制备急性胰腺炎两种动物模型十分理想；而且本方法优于传统的分离主胰管后结扎胰管或插管，不易引起创伤性胰腺炎，易于控制实验条件，又能根据研究需要复制急性水肿型或出血坏死型胰腺炎模型并进行研究。

用于制备急性胰腺炎动物模型的试剂和药品种类较多。我们选用牛磺胆酸钠和胰蛋白酶。牛磺胆酸钠是一种细胞毒性物质，其诱导胰腺损伤是浓度依赖性的；牛磺胆酸钠诱导急性胰腺炎的机制尚未完全阐明[4]。本实验血清淀粉酶和病理学变化结果表明，我们应用牛磺胆酸钠和胰蛋白酶制备杂种狗两类急性胰腺炎模型是可靠的。

关键词： 急性胰腺炎；动物模型

中图法分类号： R657.51　　**文献标识码：** B

参考文献：

[1] Aho H J, Koskensalo S M L, Nevalainen T J. Experimental pancreatitis in the rat: Sodium tauocholate-induced acute hemorrhagic pancreatitis[J]. Scand J Gastroenterol, 1980, 15(4): 411－416.

[2] 汤事能，阳亚楚，杨崇堂，等. 狗的胰腺管[J]. 中华实验外科杂志，1988，5(2)：92－93.

[3] Revell D G. The pancreatic ducts in the dog[J]. Am J Anat, 1902, 1: 443.

[4] 许春芳，蒋文平，蔡衍郎，等. 牛胆酸钠诱导大鼠急性胰腺炎系列模型的研究[J]. 新消化病杂志，1995，3(3)：130－141.

（编辑　薛国文）

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