

改进的鸡胚绒毛尿囊膜技术 ——无气室孵育法*

贺国安, 罗进贤, 张添元, 陈 宏, 孙慈煌

(中山大学生命科学学院//基因工程教育部重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 对传统的鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)方法进行改进。将孵育6 d的鸡胚去掉气室后, 将待测样品加入到CAM上, 用无菌透明胶封口, 继续孵育2~3 d, 去掉封口暴露CAM, 用甲醇/丙酮等体积混合液室温固定10 min后进行观察, 结果鸡胚血管网完好无损, 样品作用效果显示明显, 表明该方法相对于传统方法而言, 具有操作简单, 鸡胚存活率高, 样品效果显示更直观等优点。

关键词: 绒毛尿囊膜; 抗血管生成; 血管能抑素

中图分类号: Q95-336 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 02-0126-03

利用抗血管生成(antiangiogenesis)来进行肿瘤防治理论^[1]提出以来, 对各种因子在体内体外环境下对新生血管生成作用的研究得到了飞速的发展。研究各种因子对新生血管生成作用的常用技术有动物角膜囊或虹膜技术^[2]、地鼠颊囊膜技术^[3]、颅窗软脑膜和肠系膜血管技术^[4]以及鸡胚绒毛尿囊膜(chick choriollantoic membrane, CAM)技术^[5]。鸡胚绒毛尿囊膜技术是一种定性、定量研究体内血管生成的技术。它具有实验材料易得、操作简便、实验周期短、不需要特殊设备、结果易于观察等优点而得到了广泛应用。本研究以具有抗新生血管生成的血管能抑素为实验材料, 对前人的鸡胚绒毛尿囊膜技术^[6,7]进行改进, 探索出一种较传统方法更为简单、鸡胚存活率更高、样品作用效果显示更直观等优点的方法。

1 材料与方法

1.1 材料 待测的血管能抑素蛋白由本室提供; 鸡胚种蛋购自佛山鸡场; 定性滤纸、透明胶、新洁尔灭、体积浓度为75%乙醇等均为实验室日常用品。

1.2 待测样品制备 以灭菌的定性滤纸为样品载体, 事先剪成5 mm×5 mm大小, 灭菌冷却后在无菌环境下加入5~10 μL所需量的待测血管能抑素蛋白, 风干待用。

1.3 蛋胚孵育 室温将鸡胚种蛋浸泡于新洁尔灭水溶液5~10 min, 拭干后将鸡蛋气室(蛋胚大头端)向上, 长轴与蛋托呈45°, 温度在(37.6±0.2)℃, 相对湿度为60%的孵化箱中孵育。满24 h

为1 d, 每天转蛋不少于2次, 转蛋角度以水平位置前俯后仰各45°为宜。

1.4 蛋胚气室的去除 孵化第4天至第6天, 在超净台上将蛋胚用酒精消毒后用镊子在蛋胚顶端戳一小口, 然后小心地去掉周围的蛋壳和壳膜, 使开口约为1.5 cm×1.5 cm大小。此时可以看到气室底部隔着一气室膜就是CAM膜了, 并且可以清楚地看到CAM膜上血管网的大小和分布位置以及跳动的鸡胚心脏。确定加样部位后小心地用注射针头从气室与卵黄分隔处挑破气室膜, 注入1~2滴无菌水, 使气室膜与CAM膜分开, 然后用镊子轻轻去除上层的气室膜, 暴露下层的CAM膜。

1.5 加样 样品事先以体积10 μL加到5 mm×5 mm大小的灭菌定性滤纸上风干后, 用镊子轻轻将载样滤纸置于CAM和卵黄囊膜处血管较少的部位, 然后用灭菌透明胶封口, 继续孵育48 h或更长时间。

1.6 观察 孵育结束后, 用镊子轻轻去除鸡胚气室端堵塞的透明胶, 轻轻加入甲醇/丙酮等体积混合液1~2 mL, 室温固定10 min, 小心地用镊子从气室端揭去周围的蛋壳, 最大程度暴露CAM便于观察和拍照。也可剥离CAM膜, 铺在滤纸上阴干保存。

2 结 果

2.1 CAM的生长状况 从孵育第2天开始, 每天取一个蛋胚从气室端开一个小口, 观察CAM的生长状况。一般情况下, 孵化4~6 d的鸡胚, CAM直径约为8~20 mm, 血管网清晰可见, 血管分布

* 收稿日期: 2002-12-13

基金项目: 广东省重点科技资助项目(2KM02502G)

作者简介: 贺国安(1974年生), 男, 博士研究生; 通讯联系人: 罗进贤; E-mail: lsbr02@zsu.edu.cn

较稀。因此选择在孵化第4至第6天的鸡胚进行开窗去除气室孵育比较适宜,此时期的血管大小约占整个蛋黄的1/2,便于加样。

2.2 蛋胚的存活率 蛋胚总数为30只,孵化第6天开窗时有未受精蛋胚(蛋黄颜色较深,无血管网,有白色圆点)2只,有未发育或死胚(无完整的血管网,无心搏)1只,鸡胚存活率为90%。去除气室,加样封口后继续孵化到第8天开口观察时,有死胚(无心搏,血管网开始溶解)4只,鸡胚存活率为85%。因此蛋胚总的存活率为77%。

2.3 血管能抑素抑制CAM血管生成的显示效果 以具有强烈抑制CAM血管生成作用的血管能抑素蛋白为测试样品,测试剂量为20 μg 。加样继续孵育48 h后,室温下用甲醇/丙酮等体积混合液固定10 min,用镊子去除气室端的蛋壳,可以清楚地观察到CAM的状态。结果如图1所示,由于甲醇/丙酮的作用,血管颜色较暗,在载样滤纸片周围血管网分布稀少,而其他部位,血管网分布均匀、粗大,显示出血管能抑素蛋白经过载样滤纸片的缓慢释放作用,形成了一个强烈抑制CAM血管生成的作用圈。说明此方法能良好地显示样品对CAM血管生成的作用效果。

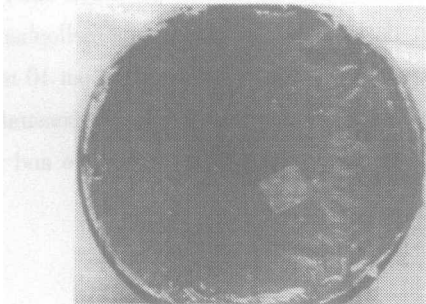


图1 血管能抑素对CAM血管生成的抑制作用

Fig.1 The inhibition of canstatin on vessel growth of CAM

3 讨论

CAM法作为一种研究体内血管效应的技术,它的发展对于研究血管的发生机制以及各种因子对血管生成作用的机制都有十分重要的意义。传统的CAM法有蛋壳上开窗^[5](简称开窗法)和将鸡胚孵育在平皿中观察^[8](简称平皿法)等方法。开窗法是在孵育第6至第9天的蛋壳上磨切开窗,将样品植入后再封闭切口继续孵育。经过实践发现开窗法需要事先通过照卵灯确定胚头的大致位置才能决定开窗位置,由于蛋壳厚薄、颜色等原因很难准确确定合适的开窗位置,使得样品的加入位置不太统一,影响了试验效果的观察。由于CAM紧贴在壳

膜上,磨切蛋壳时很容易破裂CAM,使得蛋胚的存活率降低。于是有了将鸡胚孵育在平皿中观察的平皿法^[8]。平皿法是将孵育3 d的鸡胚无菌条件下移入平皿中继续孵育3 d,加样后再继续孵育24 h或更长时间才进行观察。该方法克服了开窗法难以确定合适的加样部位的缺陷,它可以使平皿中孵育的CAM水平生长,整个血管网清晰可见,能使样品植入部位一致,并可在同一部位多次给药,观察结果简便可靠。但试验过程中发现,平皿法需要将鸡蛋中的鸡胚打入平皿中,这是过程的难点,在打蛋的过程中,对CAM的丝毫损伤都会影响CAM的孵育。我们发现,刚打出来的鸡胚似乎完好无损,但在平皿中孵育2~3 d后很多蛋黄都散开了。加上在打蛋的过程中能够把胚头刚好打在蛋黄中央的机率较少,这极大地降低了蛋胚的存活率。另外,将鸡胚移入平皿后机械刺激、温度变化、脱离蛋壳的人造环境等因素使鸡胚死亡率增高^[7],因而打入平皿后的鸡胚一般只能存活2~4 d,这大大地降低了样品对CAM血管生成作用时间的观察以及蛋胚的利用率(只有约34%^[7])。

本研究汲取了开窗法和平皿法优点,避开了两者的缺点,采用从蛋胚的气室端开口去除气室后孵育的无气室孵育法。蛋胚的气室端有一气室,从此开口不会破坏CAM。并且开口后,可以借此清楚地观察到CAM上血管网的生长状况,确定最佳的加样部位。加样后用透明胶封口,在继续孵育过程中还可以观察CAM上血管网的生长状况,决定合适的样品作用时间。孵育结束后用甲醇/丙酮固定,CAM上血管网以及加样部位不易发生位移,便于结果的直观显示。无气室孵育法在整个试验过程中,鸡胚都在蛋壳中孵育,汲取了开窗法的优点,避免了平皿法将鸡胚移入平皿后的机械刺激、温度变化、脱离蛋壳的人造环境等因素对鸡胚的损伤,同时在该方法过程中较少有机会损伤到CAM,因此该方法的蛋胚存活率较高,可以达到77%。此方法的关键点在于气室的去除,需要小心地用注射针头从气室与卵黄分隔处挑破气室膜,注入1~2滴无菌水,使气室膜与CAM膜分开后再去除上层的气室膜。

参考文献:

- [1] FOLKMAN J. Clinical application of research on angiogenesis [J]. N Engl J Med, 1995, 333: 1757 - 1763.
- [2] GIMBRONEY M, GRTAN R S, FOLKMAN J, et al. Tumor growth neovascularization: an experimental model using rabbit cornea [J]. J Natl Cancer Inst, 1974, 52: 413 - 427.

- [3] SCHREIBER A B, WINKLER M E, DERNYCK R E, et al. Transforming growth alpha: a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor[J]. Science, 1986, 232: 1250 – 1253.
- [4] JAIN R K, SCHLENGER K, HOCKEL M, et al. Quantitative angiogenesis assays: progress and problems[J]. Nature Medicine, 1997, 3: 1203 – 1208.
- [5] PEEK M J, NORMAN T M, MORGAN C, et al. The chick chorioallantoic membrane assay: an improved technique for the study of angiogenic activity[J]. Exp Pathol, 1988, 34: 35 – 40.
- [6] 付生法, 陆应麟, 张朝山, 等. 检测血管生成作用的鸡胚绒毛尿囊膜技术[J]. 军事医学科学院院刊, 1993, 17 (4): 294 – 297.
- [7] 呼群, 宁涛, 苏秀兰, 等. 鸡胚绒毛尿囊膜技术的改进[J]. 北京大学学报(医学版), 2001, 33(4): 383 – 385.
- [8] CRUM R, SZABO S, FOLKMAN J. A new class of steroids inhibits angiogenesis in the presence of heparin or a haparing fragment[J]. Science, 1985, 230: 1375 – 1378.

Improved Chick Chorioallantoic Membrane Technique —— Incubation Without Air Chamber

HE Guo-an, LUO Jin-xian, ZHANG Tian-yuan, CHEN Hong, SUN Ci-huang

(School of Life Sciences//

Key Laboratory of Genetic Engineering of Ministry of Education,

Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: It is an improved technique of the conventional technique of chick chorioallantoic membrane (CAM). The air chamber of the three days' chick embryo was removed, the canstatin was added onto the CAM, the chick embryo was covered again by aseptic cellophane. After incubating for two or three days, the covered aseptic cellophane was removed, and the CAM was fixed with the mixture of methyl alcohol and acetone at room temperature for about 10 min. It resulted an intact blood vessel rete with visible inhibition of canstatin on CAM angiogenesis. This demonstrates the improved technique of CAM has the advantages of simple manipulation, high survival rate of chick embryo and visible effect of drugs on CAM contrast to the conventional technique of CAM.

Key words: chorioallantoic membrane; antiangiogenesis; canstatin