

在细胞因子产生方面受到削弱是由于T细胞发育缺失所致,而不是由于OPGL对成熟T细胞的作用所致。

4. *opgl*^{-/-}小鼠完全缺乏淋巴结

对*opgl*^{-/-}小鼠的次级淋巴器官进行解剖学分析,发现肠系膜、颈部、下颌骨、腹股沟、腋部、副主动脉和腠动脉处缺少淋巴结。对这些部位进行组织化学切片分析证实,缺少类似于早期的淋巴结原基的组织。将*opgl*^{-/-}胚胎肝细胞转移到*ragl*^{-/-}小鼠中表明,*opgl*^{-/-}T细胞和B细胞能够使淋巴结增殖。这表明缺少淋巴结是由于细胞自引导缺失所致。转移正常的骨髓细胞到新生的*opgl*^{-/-}小鼠中并不能恢复淋巴结形成。

尽管*opgl*^{-/-}小鼠缺少所有淋巴结,但是仍然能观察到淋巴集结(Peyer's patches)。*opgl*^{-/-}小鼠淋巴集结也含有B细胞和T细胞区,并且具有完整的脾脏结构,该脾结构含有正常的红髓和白髓,正常的T细胞和B细胞分离区,以及含有T细胞和B细胞区的滤泡结构、边缘区以及泡状和网状树突细胞网。这些结果表明缺少OPGL对于脾结构以及淋巴集结的形成没有明显的影响,但是OPGL表达对于淋巴结形成是必需的。

研究工作

平阳霉素对鸡胚绒毛尿囊膜血管内皮细胞生长的影响

武利存 宋守芹 王 丽 张维东 孙公甲

(山东省医学科学院基础医学研究所 济南 250062)

内皮细胞的移动与增殖是血管生成过程的主要内容。血管生成不仅存在于胚胎发育、黄体形成等生理过程,而且在许多病理过程如恶性肿瘤、风湿性关节炎、糖尿病视网膜病变、银屑病、创伤愈合中起重要作用^[1]。因此,血管

生成与抑制研究成为近年来广为关注的热点。特别是抑制血管生成成为控制肿瘤生长和抗转移开辟了一条新的途径而日益受到重视^[2-3]。而

本文1999年6月14日收到,2000年1月12日接受。

摘 要

OPGL是OPG(osteoprotegerin)的配体。人*opgl* cDNA编码317个氨基酸的多肽,是一种跨膜蛋白。研究表明OPGL是一种新发现的破骨细胞分化因子。破骨细胞前体在OPGL的作用下,可分化为成熟的破骨细胞。OPGL可激活离体的成熟破骨细胞吸收骨质。最新的研究表明,*opgl*-knockout小鼠出现严重的石骨症,对骨骼再造形具有重要的作用;并且小鼠的胸腺细胞和B淋巴细胞的发育受阻,淋巴结的器官发生也受到抑制,不能形成淋巴结。

参 考 文 献

- [1] Lacey, D L, et al., 1998, *Cell*, **93**: 165 - 176.
- [2] Yasuda, H, et al., 1998, *PNAS. USA.*, **95**: 3597 - 3602.
- [3] Wong, B R, et al., 1997, *J. Biol. Chem.*, **272**: 25190 - 25194.
- [4] Anderson, D M, et al., 1997, *Nature*, **390**: 175 - 179.
- [5] Simonet, W S, et al., 1997, *Cell*, **89**: 309 - 319.
- [6] Reddi, A H, 1997, *Cell*, **89**: 159 - 161.
- [7] Kong, Y-Y, et al., 1999, *Nature*, **397**: 315 - 323.
- [8] Mostov, K, et al., 1997, *Science*, **276**: 219 - 220.
- [9] Saol, J, et al., 1997, *Science*, **276**: 270 - 273.
- [10] Lagasse, E, et al., 1997, *Cell*, **89**: 1021 - 1031.

大多数血管生长抑制剂都是抑制内皮细胞(endothelial cell, EC)的移动与增殖。由此可见,研究 EC 移动与增殖的实验方法显得尤为重要。

本文介绍一种研究血管 EC 移动和增殖的体内实验方法——鸡胚绒毛尿囊膜(chorioallantoic membrane, CAM)法,并用此法研究平阳霉素(pingyangmycin, PY)对 CAM 血管内皮细胞生长的影响。鸡胚 CAM 是在胚龄 4-5 天时由绒毛膜的体壁中胚层和尿囊膜的脏层中胚层融合而成的。在孵育至第 6-7 天时 CAM 及其血管覆盖了整个卵黄囊表面,大部分绒毛膜与壳膜相接触。尿囊体积迅速增大,绒毛膜尿囊膜的两中胚层互相融合。CAM 的组织学结构有三层:外胚层,位于壳膜下方,由来自绒毛膜的上皮组成;中胚层,是一层富含毛细血管的结缔组织;内胚层,位于尿囊,由来自尿囊膜的内皮形成。CAM 是一体外呼吸器官,随胚龄增加而增大,且毛细血管极其丰富^[4]。

材料与方法

1. 材料

Leghorn 鸡胚由山东省农科院家禽研究所提供,³H-TdR 和核 IV 型乳胶均由北京中国原子能研究院提供,盐酸平阳霉素(PY)由天津河北制药厂生产(批号 971026)。另外还有孵箱、牙科电动钻、检蛋灯、载体、透明玻璃纸、Carnoy 固定液、暗盒、显影液、定影液、中性加拿大树胶、立体显微镜、摄影显微镜等。

2. 方法

(1)PY 对血管 EC 移动的影响 取 Leghorn 鸡胚在 38℃ 和 60% 相对湿度下孵育至第 7 天时,将鸡胚随机分为对照组和实验组。对照组:分别取胚龄第 8、10、12、14、16 和 18 天的鸡胚各 5 枚,无菌条件下,在气室端(胚蛋大头端)用电动牙科钻锯一 $1 \times 2 \text{ cm}^2$ 的小窗,小心去除蛋壳,暴露壳膜,以 10% 甲醛固定,并用细针头注射 10% 甲醛少许至 CAM 下使其固定。实验组:取第 8 天的胚蛋 10 枚,暴露壳膜(方法同上),将一吸附有 $5 \mu\text{g}$ PY 的玻璃纤维滤纸载体($\Phi 5 \text{ mm}$)置于壳膜中央,用透明玻璃纸密封蛋壳,放入孵箱中。隔日一次取出胚蛋,掀开玻璃纸,往载体上滴加 $5 \mu\text{g}$ PY,密封后放回孵箱。第 18 天时,取出胚蛋,揭去玻璃纸,用 10% 甲醛固定壳膜和 CAM。将两组固定后的壳膜和 CAM

各剪取 $2 \times 2 \text{ cm}^2$,在 10% 甲醛中继续固定,待做组织学检查。判断 EC 移动的标准:在 100 倍视野下通过显维电视系统计数移至外胚层与壳膜之间的毛细血管数和内皮细胞数。

(2)PY 对血管 EC 增殖的影响 取胚龄为 10 天的 Leghorn 胚蛋 20 枚,分为对照组和实验组,每组 10 枚。用假气室法,在蛋壳上开一 $1 \times 2 \text{ cm}^2$ 的小窗,小心拨去蛋壳和壳膜,暴露 CAM。实验组将一吸附有 $5 \mu\text{g}$ PY 的玻璃纤维滤纸载体置于 CAM 中央;对照组在 CAM 上放一吸附 PBS(pH7.0) $10 \mu\text{l}$ 的玻璃纤维滤纸载体。然后,在每个鸡胚 CAM 上滴加 $^3\text{H-TdR}$ $7.4 \times 10^5 \text{ Bq}$,用透明玻璃纸密封后放回孵箱中。5 小时后取出胚蛋,掀去玻璃纸,用适量 Carnoy 液固定 30 分钟,以载体为中心剪下 CAM 约 $2 \times 2 \text{ cm}^2$,继续固定 6-12 小时后,做组织学切片,片厚 $5 \mu\text{m}$,并做常规 H-E 染色,不封片。将染好的切片,在暗室内涂乳胶膜。将室温下干燥的制片放入暗盒中,在 4℃ 冰箱中曝光 10-14 天。曝光完毕经显影和定影,风干,封片^[5]。

结 果

1. PY 对血管 EC 移动的影响

对照组 在孵育第 8 天时,CAM 的内、中、外胚层三层结构已经形成。毛细血管都位于中胚层内,这些毛细血管相互连接形成血管网在绒毛膜上皮细胞下方。EC 外形扁平,只有在核区稍增厚。CAM 毛细血管壁仅有 1-2 个这种 EC 构成。EC 核亦呈梭形,不突向管腔,因此管腔平滑,几乎呈圆形或椭圆形。核质淡染,含有一明显核仁,核内见少量染色质。

第 10 天时,CAM 毛细血管仍位于外胚层上皮细胞之下。EC 改变与第 8 天相似。

第 12 天时,CAM 毛细血管开始向绒毛膜上皮细胞层及其上方移动,与壳膜更加接近。EC 核变圆,使该区向血管腔突出,核染色质明显增加。

第 14 天时,CAM 毛细血管已完成向绒毛膜上皮上方的移动,EC 移至外胚层上方,与壳膜紧贴。EC 靠近壳膜的一侧明显变薄。

第 16 和 18 天时,毛细血管 EC 位于外胚层上皮细胞上方,与壳膜紧贴,与第 14 天时所见相同。EC 核更圆,核区常向血管腔突出,核

染色质深染,富含染色质,EC核多位于远离壳膜的一侧(图版图1)。

实验组 第18天时,CAM毛细血管EC移动受到明显抑制,仍停留于外胚层上皮细胞的下方,距壳膜较远(图版图2)。与对照组中第8和10天时所见相似。

两组移至外胚层与壳膜之间的毛细血管数和内皮细胞数比较(表1)。对照组见大量毛细血管移至CAM外胚层之上,且见毛细血管融合成血管窦,难以计数,或见交通支与中胚层相通。

表1 两组移至外胚层与壳膜之间的
毛细血管数和内皮细胞数比较

组别	毛细血管数	内皮细胞数	P
对照组	11.08 ± 3.21	13.52 ± 2.87	
实验组	1.24 ± 0.15	2.92 ± 0.85	<0.01

由此可见,PY可抑制CAM毛细血管EC的移动,使第18天胚龄时早已该移至外胚层之上的毛细血管EC仍停留在外胚层上皮细胞层之下。抑制EC移动可能是其抑制血管新生的重要机制之一。

2. PY对血管EC增殖的影响

在光学显微镜下观察处于外胚层绒毛膜上皮细胞下方并与之紧靠的毛细血管或血窦EC的³H-TdR标记率。因为这时胚龄已10天,大部分毛细血管都接近外胚层的绒毛膜上皮,比较容易观察。如果每个细胞银粒少于3个,即被认为是本底标记数而认为该细胞是不被标记的,我们规定如果一个细胞内银粒数大于10个,就认为这个细胞被标记。在油镜下每次计数100个EC,共4次,对照组与实验组EC的³H-TdR标记率平均值分别为41.5% ± 3.4%和20.3% ± 1.5%(图3、4)。经统计学处理,两组间有非常显著性差异(P<0.01)。说明PY可使CAM毛细血管EC的³H-TdR标记率明显降低,DNA合成减少,即抑制EC增殖。

讨 论

迄今,研究EC移动的方法有Boyden室法

(Boyden chamber assay)^[6]、吞噬动力轨迹法(Phagokinetic track assay)^[7]及Linear under-agarose assay^[8]等,上述方法均为体外EC培养法,十分复杂。Ausprunk等报告用电镜观察EC有无伪足来判断EC移动^[9],但费用太高,而且操作与观察技术要求高而复杂。因此作者设想能否用较简单的办法研究EC移动,果然在一次观察CAM组织学结构时发现孵育第9天的CAM毛细血管EC都位于外胚层绒毛膜上皮之下,而孵育至第14天后CAM毛细血管EC大都移至上皮之上,紧贴壳膜。这是因为胚胎发育需要越来越多的弥散氧气之故。PY能抑制CAM毛细血管EC移动,使其停留在绒毛膜上皮之下。

在鸡胚发育中,胚龄10天时CAM毛细血管EC分裂增殖最旺盛,DNA合成达到高峰期^[9],因此,选用第10天的鸡胚做³H-TdR标记最便于观察。结果表明PY能抑制EC增殖,是抑制血管生成的又一重要机制。

CAM上能被³H-TdR标记的细胞除EC外,还有绒毛膜细胞(chorionic ectodermal cells)、尿囊内胚层细胞(allantoic endodermal cells)、结缔组织细胞和血细胞。在鉴别一个被标记的细胞是不是EC时,主要根据CAM的组织学结构特点。第10天时,CAM毛细血管EC大多移近外胚层,集中在绒毛膜上皮下方,毛细血管或血窦管腔清晰,并常可见到红细胞,血管壁上能被标记的细胞只有EC,所以不难识别。

PY是一细胞毒类抗肿瘤抗生素。作者证明它不仅可强烈抑制鸡胚CAM的血管生长,还可抑制S₁₈₀、Lewis肺癌等肿瘤的血管生成。本文证明PY抑制血管生成的机制是抑制EC的移动和增殖。另外,郑勤田等在局部注射PY治疗小儿血管瘤和淋巴管瘤这两种内皮细胞增殖性肿瘤临床实践中已取得了满意的疗效^[10,11]。提示PY是一有潜力的血管生长抑制剂。鸡胚CAM可作为研究EC移动和增殖的体内模型,用于血管生成刺激因子和抑制因子的筛选和研究。

摘 要

利用鸡胚绒毛尿囊膜研究平阳霉素对血管内皮细胞移动和增殖的影响。(1)内皮细胞移动:采用组织学切片、常规 H-E 染色,通过观察不同胚龄鸡胚 CAM 的组织学结构即可判定毛细血管 EC 移动。发现鸡胚在第 8、10、12 天胚龄时 CAM EC 都位于外胚层绒毛膜上皮之下,随胚龄增大,EC 逐渐由中胚层移向外胚层。而孵育至第 14 天后(16、18 天)CAM 毛细血管 EC 大都移至外胚层上皮之上,紧贴壳膜。PY 可明显抑制 EC 移动,使第 18 天胚龄时早已该移至外胚层之上的毛细血管 EC 仍停留在外胚层上皮之下。(2)内皮细胞增殖:用放射自显影技术对第 10 天胚龄的鸡胚 CAM EC 进行³H-TdR 标记,标记率即反映 EC 增殖的程度。同时用血管生长抑制剂 PY 对比研究对 EC 增殖的影响。对照组和实验组 EC ³H-TdR 标记率

分别为 $41.5 \pm 3.4\%$ 和 $20.3 \pm 1.5\%$, PY 可使 CAM EC 的 DNA 合成减少,即抑制 EC 增殖。鸡胚 CAM 可作为研究 EC 移动和增殖的体内模型,用于血管生成刺激因子和抑制因子的筛选和研究。

关键词:鸡胚绒毛尿囊膜 血管内皮细胞
增殖 平阳霉素

参 考 文 献

- [1] Harris SR, et al., 1998, *In Vivo*, **12**(6):563.
- [2] Liu Y, et al., 1999, *J. Biol. Chem.*, **274**(19):13338.
- [3] Nguyen JT, et al., 1998, *Cancer Res.*, **58**(24):5673.
- [4] Leeson TS, et al., 1962, *J. Anat.*, **97**(4):585.
- [5] Hobson B, et al., 1984, *Br. J. Cancer*, **49**:405.
- [6] Giulio A, et al., 1983, *Cancer Res.*, **43**:1790.
- [7] Zetter BR, et al., 1980, *Nature*, **285**:41.
- [8] Maria AR, et al., 1988, *Lab. Invest.*, **59**(3):363.
- [9] Ausprunk DH, et al., 1974, *Dev. Biol.*, **38**:237.
- [10] 郑勤田等, 1991, 中华外科杂志, **29**(3):290.
- [11] 蒋嘉萍, 1991, 临床儿科杂志, **9**(1):55.

THE EFFECT OF PINGYANGMYCIN ON THE PROLIFERATION OF ENDOTHELIAL CELLS OF THE CHICK CHORIOALLANTOIC MEMBRANE(CAM)

WU Li Cun SONG Shou Qing WANG Li ZHANG Wei Dong SUN Gong Jia
(Institute of Basic Medical Sciences, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062)

ABSTRACT

To introduce an in vivo model-chick chorioallantoic membrane(CAM) as a means of investigating endothelial cell migration and proliferation. (1) Endothelial cell migration assay: EC migration can be evaluated by observing the histological changes of chick embryonic CAM at certain intervals after incubation. The histological section of CAM was stained with routine hematoxylin and eosin. We discovered that CAM EC on day 8, 10, and 12 after incubation localized beneath the chorionic ectoderm, but with the age growing, EC gradually migrated toward ectoderm from mesenchyme. EC migration was completed on day 14 and localized between ectoderm and shell membrane. Whereas in the PY-treated group, EC was still beneath ectoderm even on the 18th day. (2) EC proliferation assay: Thymidine autoradiographical technique was employed to investigate EC ³H-TdR labelling rate which represents the degree of EC proliferation. ³H-TdR labelling index of the control and PY group was $41.5 \pm 3.4\%$ and $20.3 \pm 1.5\%$, respectively. EC proliferation was inhibited significantly by PY. So a conclusion may be drawn that chick embryonic CAM can be used as an in vivo model to investigate EC migration and proliferation, furthermore, to detect angiogenesis promoters and inhibitors.

Key words: Chorioallantoic membrane(CAM) Endothelial cell(EC) Proliferation Pingyangmycin(PY)

本刊 2001 年第一期“动点蛋白功能的研究进展(综述)”一文的联系人为姚雪彪。