

宫颈癌细胞促进血管新生斑马鱼模型的建立

刘军秀, 夏梦, 何勉, 姚书忠*

(1.中山大学附属第一医院 妇产科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】建立宫颈癌细胞异种移植斑马鱼模型,研究其对血管新生的影响。【方法】以斑马鱼作为研究对象,使用线性化的红色荧光质粒 pcDNA3.0+DsRed 转染人宫颈癌 SiHa 细胞,通过显微注射法将稳定表达红色荧光的 SiHa 细胞移植入 48 hpf(发育后时数)的 FLK 转基因斑马鱼胚胎内,建立人宫颈癌斑马鱼模型,观察人宫颈癌细胞在斑马鱼胚胎体内存活、增值和诱导血管增生情况,探讨宫颈癌细胞对斑马鱼模型血管新生的影响。【结果】注射不同数量人宫颈癌 SiHa 细胞对斑马鱼卵有不同的影响,其中注射 50~100 个细胞产生最佳的促进血管新生作用。注射 Matrigel 的对照组斑马鱼在注射后的第一天和第二天突出到肠下静脉血管管外到卵黄的垂直分枝平均血管数频率分别为 $2.8\% \pm 1.4\%$ 和 $5.4\% \pm 2.2\%$ 。而注射人宫颈癌细胞系 SiHa 的斑马鱼的新生血管数比对照组明显增加,在注射后第一天和第二天突出到肠下静脉血管管外到卵黄的垂直分枝平均血管数频率分别为 $8.0\% \pm 2.7\%$ 和 $27.4\% \pm 3.2\%$ ($P < 0.01$)。【结论】本研究成功建立宫颈癌细胞促进血管新生的斑马鱼模型,这为研究宫颈癌的发病机制、筛选新的抗肿瘤血管生成化合物和基因靶点研究提供了新的技术平台。

关键词: 宫颈癌; 斑马鱼; 血管新生

中图分类号: R746.4

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2015)03-0456-05

Pro-angiogenic Effects of Cervical Cancer Cells in a Zebrafish Xenotransplantation Model

LIU Jun-xiu, XIA Meng, HE Mian, YAO Shu-zhong*

(Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Corresponding to: YAO Shu-zhong, mail: yszlfy@163.com

Abstract:【Objective】 To establish a zebrafish xenotransplantation model of cervical cancer and investigate the pro-angiogenic effects of cervical cancer.【Methods】 A linearized plasmid pcDNA3.0 vector expressing Ds-Red fluorescent protein were used to fluorescently label human cervical cancer SiHa cells. The fluorescent-labeled SiHa cells were then transplanted into the FLK 48 hpf transgenic zebrafish embryos using microinjection. The survival, proliferation and induction of angiogenesis were evaluated in zebrafish xenotransplantation embryos and larvae. 【Results】 Different numbers of xenograft human cervical cancer SiHa cells had different effects on zebrafish and transplantation of 50-100 c SiHa cells achieved an excellent angiogenesis. Xenograft SiHa cells significantly increased new blood vessels compared with the control group. The numbers of the vertical branch of subintestinal vein outside yolk in matrigel control group and xenograft group were $2.8 \pm 1.4\%$ and $8.0 \pm 2.7\%$ in day 1, $5.4 \pm 2.2\%$ and $7.4 \pm 3.2\%$ in day 2 after injection (all $P < 0.01$).【Conclusion】 This study has successfully established zebrafish xenotransplantation model of cervical cancer and demonstrated the pro-angiogenesis of cervical cancer, which provides a new technology platform for the study of the pathogenesis of cervical cancer development of new compounds and gene targets for anti-tumor angiogenesis.

Key words: cervical cancer; zebrafish; angiogenesis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2015, 36(3):456-460]

宫颈癌(cervical cancer)是危害广大妇女健康最常见的恶性肿瘤之一。近年来,年轻妇女中宫颈癌的发病率呈明显上升的趋势^[1]。现有治疗手段

均有一定的局限性,因此如何研究和发现防治宫颈癌的新技术和新方法是一个重要而迫切的课题。本研究使用了线性化的红色荧光质粒

收稿日期:2014-12-05

基金项目:广东省科技计划项目(2013B021800125);广东省自然科学基金(2014A030313038)

作者简介:刘军秀,主治医师,研究方向:妇科疾病相关研究,E-mail: liujunxiu99@163.com; * 通信作者:姚书忠,教授,主任医师, E-mail: yszlfy@163.com

pcDNA3.0+DsRed 转染人宫颈癌 SiHa 细胞,通过流式细胞技术和抗牛素 G418 筛选稳定表达红色荧光的人宫颈癌细胞,然后用显微注射法将宫颈癌细胞移植入转基因斑马鱼体内,观察人宫颈癌细胞是否能在转基因斑马鱼胚胎体内存活、增殖并诱导血管增生,为研究宫颈癌的发病机制和筛选抗血管生成药物提供新的平台。

1 材料与方 法

1.1 材 料

Lipofectamine2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司。实验用 pcDNA3.0+DsRed 质粒由本实验室保存。人宫颈癌 SiHa 细胞购买于 ATCC (American type culture collection)。DMSO、Matrigel 购买于 Sigma 公司, DH5 α 感受态细胞购买于 TIANGEN 公司,显微注射的硅硼毛细玻璃管购买于 HARVARD 公司,丰年虾卵购买于 HOPE 公司, 10 \times Holt Buffer (用于幼鱼培养): NaCl 35 g、KCl 0.5 g、NaHCO₃ 0.25 g、CaCl₂ 1 g, 用水补至 1 L。1 \times Danieu 溶液 (mmol/L): NaCl 8、KCl 0.7、Ca(NO₃)₂ 0.6、pH 7.6 HEPES 5.0, 水补至 1 L。Tricaine 溶液(麻醉剂): Tricaine 粉末 4 g/L 溶于 Holt Buffer, 即为 25 \times 储液, -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 一般情况下用 5 \times (0.08%)溶液。甲基纤维素溶液 3 g/L 加到 Holt Buffer 中, 溶解后分装放 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2 人宫颈癌 SiHa 细胞的培养

人宫颈癌 SiHa 细胞在加入 100 mL/L 胎牛血清, 10 g/L 双抗(青霉素、链霉素)的 DMEM 培养基中于体积分数为 5%的 CO₂ 的细胞培养箱中 37 $^{\circ}$ C 下培养, 每天换一次新鲜的培养液。用 2.5 g/L 蛋白酶消化传代, 每隔两天传代一次, 传代时胰酶消化 1~2 min 至细胞微微鼓起变圆便立即吸走胰酶, 并加入培养液终止消化, 吹匀 SiHa 细胞, 按着 1:3 的比例传代。

1.3 Lipofectamine2000 转染 SiHa 细胞

将培养中的 SiHa 细胞消化计数后加入 24 孔细胞培养板, 使每个孔的 500 μ L 培养基中含有 (0.5~2) \times 10⁵ 个细胞, 培养 24 h。待细胞丰度为 90%时, 将 2 μ L 的 lipofectamine2000 加入到 50 μ L 的无血清 DMEM 培养基中, 轻轻混合, 室温孵育 5 min; 将 1 μ g 线性化的 pcDNA3.0+DsRed 加入到 50 μ L 无血清的 DMEM 培养基中, 轻轻混合, 室温

孵育 20 min。吸去 24 孔板中含血清的 DMEM 培养基, 加入 400 μ L 无血清 DMEM 培养基, 再将 100 μ L 混合液加入到 400 μ L 的无血清培养基中, 来回移动平板使之混合。4~6 h 后换液, 吸去无血清的培养基加入 1 mL 含有血清的 DMEM 培养基, 37 $^{\circ}$ C 继续培养 12~24 h。

1.4 稳定的带有红色荧光标记的人宫颈癌 SiHa 细胞的筛选

使用流式细胞仪筛选带有红色荧光标记的人宫颈癌 SiHa 细胞, 筛选的细胞需充分消化, 使每个细胞成单克隆状态, 无细胞聚集和细胞团。筛选后使用含有 300 μ g/mL G418 的 DMEM 培养基继续传代培养荧光标记细胞 3~4 代。使用细胞冻存液, 将稳定转染成功的带有红色荧光标记的人宫颈癌 SiHa 细胞, 以 10⁶ 的浓度转入细胞冻存管中, 每管冻存约 1 mL 的细胞, 做好标记, 转入冻存盒。-80 $^{\circ}$ C 保存过夜, 第 2 天再转入液氮罐中, 待注射时复苏使用。

1.5 将红色荧光标记的人宫颈癌 SiHa 细胞显微注射入斑马鱼胚胎

1.5.1 磨针 毛细管玻璃针(内径 0.58 mm, 外径 1 mm) 用拉针仪拉针成形(参数: Heater lever=90 $^{\circ}$ C, Main Magnet=60, Sub Magnet=35.3), 将拉针保存于洁净干燥盒子中。使用时, 置于磨针器上, 在目镜下调节注射针与水平线为 45 $^{\circ}$, 转速为极速, 开始磨针, 10 min 后取下。

1.5.2 显微注射 受精后 48 h 的斑马鱼胚胎处于孵化期, 胚胎已基本成型。注射前先用链霉蛋白酶对斑马鱼胚胎进行脱膜处理, 再将斑马鱼胚胎用 0.5 g/L tricaine 麻醉液麻醉后放置于 0.5%湿润的琼脂糖凝胶上, 腹部朝下, 头朝上定位。使用显微注射仪, 将准备好的不同数量的悬浮于 Matrigel 的红色荧光标记的人宫颈癌 SiHa 细胞植入斑马鱼胚胎肠下血管的卵周膜间隙^[2], 注射细胞量分为 3 组: 0~50 个细胞组, 50~100 个细胞组和 100~200 个细胞组。注射后转入含有 Holt Buffer 下培养。同时使用 Matrigel 注射组作为正常对照组, 注射部位、注射体积和其他实验条件均与 SiHa 细胞注射组相同。

1.6 鉴定显微注射效果

培养至 96 hpf (发育后小时数, hours post fertilization), 于倒置荧光显微镜下, 观察转基因斑马鱼的血管生成情况。用吸管将斑马鱼转移到凹

槽玻片上,滴入 Tricaine 将其麻醉,在凹槽玻片上,滴 3% 甲基纤维素,用吸管吸取鱼胚,竖直放置待鱼胚下沉到管口,轻轻挤压稍许将其滴到甲基纤维素表面。用发针拨动鱼胚,调整其姿势使适合观察,在倒置荧光显微镜下进行绿色荧光血管的观察。计算肠下血管篮里的血管数和/或突出到肠下血管篮外到卵黄的垂直分枝血管数。观察、拍照完毕后,在甲基纤维素上滴 Holt Buffer 将其软化,然后温和地吹吸以释放胚胎。将胚胎放回培养液中待其自然苏醒。

1.7 统计学处理

所有数据用 SPSS 13.0 软件包进行统计分析。计量资料以“均数 \pm 标准差”表示,采用单因素的方差分析比较各组结果。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 使用倒置荧光显微镜观察人宫颈癌细胞系 SiHa 的转染效果

使用脂质体转染技术将线性化的质粒 pcDNA3.0+DsRed 转染至人宫颈癌 SiHa 细胞中,并通过流式细胞仪和 G418 抗生素的筛选,成功构建出人宫颈癌稳定表达红色荧光蛋白的 SiHa 细胞(图 1)。

2.2 斑马鱼胚胎血管增生模型的建立

斑马鱼从受精卵到后期的正常发育可耐受的温度变化从 23 ~ 34℃,标准饲养温度为 28℃,而人类细胞标准培养温度却为 37℃,我们观察到,如果 48 hpf 的斑马鱼的饲养温度从 28℃ 增加 35℃ 后,其发育正常并存活到 9 dpi(注射后天数, day post injection)。如图 2 所示,0 到 48 hpf 的斑马鱼在 28℃ 下培养,48 hpf 后在 35℃ 培养,与受精后一直 28℃ 下培养相比,斑马鱼的形态是一样的,肉眼检查心脏、肝脏、胰腺和小肠均没有发现明显的缺陷,因此我们实验的斑马鱼均在 35℃ 下饲养。

将不同数量的人宫颈癌 SiHa 细胞注入 48 hpf 的斑马鱼卵黄囊内,虽然斑马鱼的卵黄囊能够耐受 100 ~ 200 个注射细胞,但注射后可能因为注射的细胞体积大而而引起卵黄囊内压力增加,我们观察到红色荧光标记的人宫颈癌 SiHa 细胞排出到周围的养鱼水里。50 ~ 100 个注射细胞组和

0 ~ 50 个注射细胞组都没有红色荧光细胞排出,因此,最适细胞注射量为 50 ~ 100 个。

注射 Matrigel 的对照组斑马鱼在注射后的第 1 天和第 2 天突出到肠下静脉血管篮外到卵黄的垂直分枝平均血管数频率分别为 $2.8\% \pm 1.4\%$ 、 $5.4\% \pm 2.2\%$ 。而注射人宫颈癌细胞系 SiHa 的斑马鱼的新生血管数比对照组明显增加,在注射后第 1 天和第 2 天突出到肠下静脉血管篮外到卵黄的垂直分枝平均血管数频率分别为 $8.0\% \pm 2.7\%$ 和 $27.4\% \pm 3.2\%$ ($P < 0.01$; 图 3)。

3 讨 论

在宫颈癌的基础研究中,以往主要是通过体外实验来研究其发病的分子机制,体内的分子机制主要是通过大小鼠模型来研究,但这些与异种移植相关模型有它的固有缺点^[3]。注射细胞和化合物后,小鼠出现皮下肿块即为肿瘤形成。为了避免移植排斥反应,肿瘤细胞通常是移植到 SCID 裸鼠或免疫抑制小鼠,这些老鼠与正常小鼠相比抵抗力更差更容易受到感染和药物毒性^[4-5]。小鼠模型的另一个缺点是需要注射大量的细胞才能生成一个肿瘤模型,不适合作为一个原发肿瘤细胞的异种移植模型。在小鼠进行异种移植的研究时间需要几个星期到几个月之久。此外,小鼠异种移植模型很难显示肿瘤转移^[6],因此很难动态监测肿瘤的体内发展情况,这些缺点极大地制约了宫颈癌体内分子作用机制的研究。

斑马鱼肿瘤异种移植模型是癌症研究中的一个很有前途的替代模型^[7]。由于化学物质可以直接溶于养鱼水中,蛋白质可以注射,对细胞毒性和细胞凋亡的评价,对单体或化合物潜在的抗血管生成候选药物的筛选,就简单易懂了^[8-9]。与其他脊椎动物模型相比,斑马鱼模型有易于体内操作、给药,其基因组与人有着高度的同源性,易于进行分子遗传学实验操作等许多优点^[10]。此外,斑马鱼类似于哺乳动物复杂的循环系统和光学透明度,即使没有一个正常运作的循环也能存活 3 ~ 4 d,早期胚胎发育过程血管发生过程透明便于直接观察^[11],使斑马鱼胚胎特别适合血管生物学研究^[12]。斑马鱼的胸腺在 65 hpf 时开始形成^[13],虽然在 4 hpf 斑马鱼的胸腺中检测到 T 细胞受体(TCR α)基

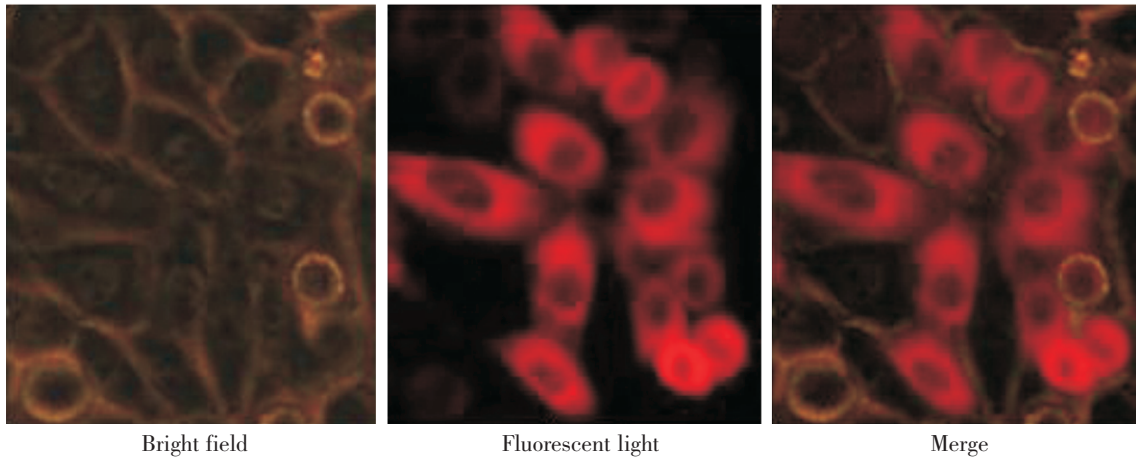
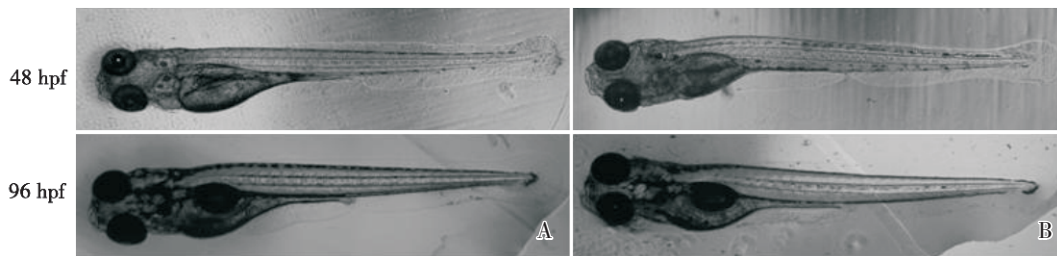


图 1 稳定表达红色荧光的人宫颈癌 SiHa 细胞系的建立

Fig.1 The establishment of human cervical carcinoma expressing Dis-red SiHa cell line



A: Zebrafish incubated at 28 °C from 0–96 hpf. B: Zebrafish incubated at 28 °C from 0–48 hpf and then at 35 °C from 48–96 hpf.

图 2 孵化温度对斑马鱼胚胎发育和生存的影响

Fig.2 Effects of different incubation temperatures on development and survival of zebrafish

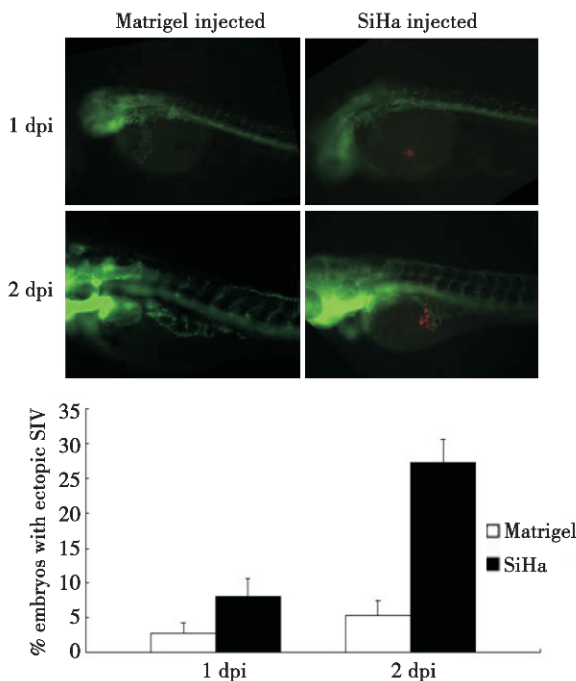


图 3 人宫颈癌细胞存活、增殖和诱导转基因斑马鱼血管增生
Fig.3 The survival, proliferation and angiogenesis in a zebrafish xenotransplantation model of cervical cancer

因表达,在斑马鱼的其他部位直到 9 dpi 时才能检测到这种 RNA, 这为早期阶段的斑马鱼异种器官移植提供了一个无排斥反应的窗口机会^[14]。Flk 1-EGFP 转基因斑马鱼是一种在血管内皮细胞表面表达 GFP 的转基因整体模型^[15],结合荧光标记细胞和荧光标记转基因斑马鱼肿瘤模型通过共聚焦显微镜和三维重建作图法可以更清晰更精细地反映出肿瘤细胞和斑马鱼微环境的变化^[16],便于通过显微镜在体内观察,还可以检测到人类癌症细胞和斑马鱼细胞以及器官的相互影响,并可以鉴定人类癌症细胞对斑马鱼血管的效应。

血管生成在肿瘤的进展和转移中起着关键的作用^[17]。肿瘤细胞释放的血管生长因子包括血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子负责着肿瘤的血管新生^[18-19],在它们缺乏的情况下,肿瘤处于休眠状态^[17]。如癌症患者用单克隆抗 VEGF 抗体贝伐单抗免疫调节药的积极成果,肿瘤诱导内皮细胞选择目标的识别对抗肿瘤疗法的发展可能产生重大的影响^[18]。

肿瘤细胞同种或异种移植动物模型的使用可

以使有限的肿瘤细胞持续分泌血管生长因子,从而模拟肿瘤血管生成和转移的初始阶段。相关研究显示在体内共培养的肿瘤细胞、大鼠主动脉环和鸡胚绒毛尿囊膜等实验上均看到肿瘤细胞与内皮细胞相互吸引^[20]。考虑到血管增生在恶性肿瘤生长中的重要作用,我们建立了人宫颈癌斑马鱼模型,通过表型的观察和统计分析,结果显示人宫颈癌 SiHa 细胞激活斑马鱼内皮细胞参与血管生成的过程中并形成新的血管。

综上所述,本研究成功建立了人宫颈癌斑马鱼模型,观察到宫颈癌细胞促进斑马鱼模型血管新生,这为研究宫颈癌的发病机制、筛选新的抗肿瘤血管生成化合物和基因靶点研究提供了新的技术平台,但其促血管新生的机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Kim K, Zang RY, Choi SC, et al. Current status of gynecological cancer in China [J]. *J Gynecol Oncol*, 2009, 20(2): 72-76.
- [2] Nicoli S, Presta M. The zebrafish/tumor xenograft angiogenesis assay [J]. *Nat Protocols*, 2007, 2(11): 2918-2923.
- [3] Hasan J, Shnyder SD, Bibby M, et al. Quantitative angiogenesis assays in vivo—a review [J]. *Angiogenesis*, 2004, 7(1): 1-16.
- [4] Kelland LR. Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development [J]. *Eur J Cancer*, 2004, 40(6): 827-836.
- [5] Yang EB, Tang WY, Zhang K, et al. Norcantharidin inhibits growth of human HepG2 cell-transplanted tumor in nude mice and prolongs host survival [J]. *Cancer Lett*, 1997, 117(1): 93-98.
- [6] van Weerden WM, Romijn JC. Use of nude mouse xenograft models in prostate cancer research [J]. *Prostate*, 2000, 43(4): 263-271.
- [7] Lam SH, Wu YL, Vega VB, et al. Conservation of gene expression signatures between zebrafish and human liver tumors and tumor progression [J]. *Nat Biotechnol*, 2006, 24(1): 73-75.
- [8] Seng WL, Eng K, Lee J, et al. Use of a monoclonal antibody specific for activated endothelial cells to quantitate angiogenesis in vivo in zebrafish after drug treatment [J]. *Angiogenesis*, 2004, 7(3): 243-253.
- [9] Ton C, Parg C. The use of zebrafish for assessing ototoxic and otoprotective agents [J]. *Hear Res*, 2005, 208(1-2): 79-88.
- [10] Thisse C, Zon LI. Organogenesis—heart and blood formation from the zebrafish point of view [J]. *Science*, 2002, 295(5554): 457-462.
- [11] Weinstein B. Vascular cell biology in vivo: a new piscine paradigm [J]. *Trends Cell Biol*, 2002, 12(9): 439-445.
- [12] Weinstein B. Vascular cell biology in vivo: a new piscine paradigm? [J]. *Trends Cell Biol*, 2002, 12(9): 439-445.
- [13] Willett CE, Zapata AG, Hopkins N, et al. Expression of zebrafish rag genes during early development identifies the thymus [J]. *Dev Biol*, 1997, 182(2): 331-341.
- [14] Danilova N, Hohman VS, Sacher F, et al. T cells and the thymus in developing zebrafish [J]. *Dev Comp Immunol*, 2004, 28(7-8): 755-767.
- [15] Rocke J, Lees J, Packham I, et al. The zebrafish as a novel tool for cardiovascular drug discovery [J]. *Recent Patents Cardiovasc Drug Discov*, 2009, 4(1): 1-5.
- [16] Stoletov K, Montel V, Lester IM, et al. High-resolution imaging of the dynamic tumor cell vascular interface in transparent zebrafish [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(44): 17406-17411.
- [17] Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases [J]. *Nature*, 2000, 407: 249-257.
- [18] Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress [J]. *Endocr Rev*, 2004, 25(4): 581-611.
- [19] Presta M, Dell'Era P, Mitola S, et al. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, 16(2): 159-178.
- [20] Lugassy C, Kleinman HK, Engbring JA, et al. Pericyte-like location of GFP-tagged melanoma cells: ex vivo and in vivo studies of extravascular migratory metastasis [J]. *Am J Pathol*, 2004, 164(4): 1191-1198.

(编辑 刘清海)