

文章编号: 1004-0374(2009)02-0312-04

鸡胚模型在生物研究中的应用进展

王 恒^{1,2}, 殷慧群², 章孝荣^{2*}

(1 安徽省畜禽遗传资源保护中心, 合肥 231283; 2 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036)

摘要: 实验动物模型在预防、诊断、治疗疾病和探讨疾病的发生机制等方面起到了至关重要的作用。鸡胚发育过程清楚, 利用鸡胚本身的结构特点, 可作为研究与胚胎发育相关的生物学实验模型。另外, 鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)血管丰富, 是天然免疫缺陷宿主, 可作为血管药理学、肿瘤学等方面研究的一个较为理想的实验模型。本文综述了鸡胚模型在生物实验研究中的应用进展。

关键词: 鸡胚; 绒毛尿囊膜; 实验模型

中图分类号: S831; Q-33 **文献标识码:** A

Research advances of chick embryo model in biological experiments

WANG Heng^{1,2}, YIN Hui-qun², ZHANG Xiao-rong^{2*}

(1 Anhui Provincial Animals Genetic Resources Conservation Center, Hefei 231283, China; 2 College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: Experimental animal models play a crucial role in the prevention, diagnosis and treatment of disease and investigation of the disease mechanism. Because the process of chick embryo development is very clear, chick embryos can be used as experiment models associated with embryo development. Furthermore, the chick chorio-allantoic membrane (CAM) is the natural immune deficiency host and rich in capillary vessel. So it can be acted as a perfect model for researching in vascular pharmacology, oncology. In this article, research advance of chick embryo model in biological experiments were reviewed.

Key words: chick embryo; chorioallantoic membrane; experimental model

实验动物模型在预防、诊断、治疗疾病和探讨疾病的发生机制等方面起到了至关重要的作用。而鸡胚发育过程清楚, 鸡蛋来源方便、经济, 所以鸡胚已成为在发育生物学、药理学、肿瘤学等方面研究的一个较为理想的实验模型。

1 鸡胚在发育生物学领域的应用进展

胚胎发育是一个极其复杂的生物进程, 要想搞清楚胚胎发育机制, 往往需要利用一些实验模型系统进行研究。鸡胚由于易于手术操作, 一直是发育生物学的经典实验模型, 到目前为止, 已经有2 300多年的历史了, 揭示了许多胚胎发育机制。通过“开窗”操作, 在早期鸡胚内异体移植特定组织揭示了胚胎发育的几大重要机制, 如Waddington的经典鸡胚实验^[1]: 将鸡胚早期原肠的亨氏节移植到

另一原肠胚的上胚层, 可诱导新胚轴的形成, 从而确定了原条期的亨氏节是各个器官发育的组织者, 且在哺乳动物胚胎实验中也证实了这一观点。另外, 结合日益成熟的细胞标记技术追踪细胞在鸡胚发育过程的运动情况, 阐明了脊椎动物胚胎发育过程中的一些基本规则, 如将鹌鹑部分胚胎组织异种移植到鸡胚组织中, 在鸡胚发育到一定阶段通过免疫组织化学分析, 阐明了胚胎发育过程中一个重要机制, 即神经嵴可衍生为几乎整个外周神经系统^[2]。除此之外, 在鸡胚发育过程中还可局部应用

收稿日期: 2008-10-19; 修回日期: 2008-12-06

基金项目: 国家自然科学基金(30600432)

*通讯作者: Tel: 0551-5786309; E-mail: zxr7652@163.com

亲脂性染料标记细胞膜来追踪细胞的短期运动或变化(染料在细胞分裂过程中会稀释), 通过此方法揭示了原肠胚形成过程中各细胞的命运图谱^[3]以及胚胎发育后期各个特定区域的发育情况^[4-6]。通过电穿孔或使用逆转录病毒将绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因导入到原条期鸡胚细胞中, 然后切除部分胚胎组织移植到同样处于原条期的宿主鸡胚中, 观察标记细胞的变化情况, 结果显示移植细胞的命运与移植位置有关, 从而揭示在早期胚胎发育过程中, 如果细胞分化程度低, 决定细胞迁移的重要因素是局部微环境^[7]。因此, 利用鸡胚模型, 可详细追踪细胞命运图谱。

近年来, 利用鸡胚局部微环境中细胞与细胞之间的相互作用, 即细胞通讯, 还可进行肿瘤细胞重编程、干细胞的分化和转分化及其相关机制方面的研究, 如对于肿瘤细胞而言, Kulesa等^[8]将人转移性黑色素瘤细胞(分化程度低)移植到宿主鸡胚神经嵴迁移前部位, 然后进行48h和96h的孵化, 结果发现鸡胚局部微环境能够引起移植的人转移性黑色素瘤细胞重编程, 分布于神经嵴迁移路径, 表现为神经嵴细胞样形态。Oppitz等^[9]将转基因鼠B16-F1黑色素瘤细胞(分化程度低)悬液注射到E2期鸡胚的神经管干部位, 同样黑色素瘤细胞能够沿着神经嵴迁移的路径分布, 且在这过程中有凋亡发生; 但是将同样的黑色素瘤细胞悬液注射到E3期鸡胚的视杯部位, 却形成了黑色素瘤。由此可看出, 鸡胚局部的微环境对肿瘤细胞的重编程有重要影响。在研究人类胚胎干细胞(hESCs)的分化中, 传统的方法是, 在体外培养条件下或在免疫缺陷鼠内看是否可形成畸胎瘤: 因鸡胚的免疫系统发育不完善, 哺乳动物细胞可在其内存活, 包括鼠类的胚胎干细胞^[10], 且研究发现将hESCs移植到鸡胚的神经干位置, hESCs在鸡胚中可存活、迁移和整合到鸡胚组织, 且部分hESCs可随植入的微环境的变化分化为相应的细胞类型^[11]。将从成人骨髓分离的CD34⁺造血干细胞(HSCs)移植到发育中鸡胚的脊髓位置, 结果发现在鸡胚脊髓再生的微环境中成人HSCs可分化为发育完好的神经元^[12]。因此, 鸡胚模型可作为在体外和啮齿类动物体内研究干细胞分化问题的一个独特的补充模型, 对于阐明在胚胎环境中人类细胞发育的早期进程有积极的意义。

随着分子生物学技术的飞速发展, 将鸡胚模型和转基因技术结合起来能更好地研究基因功能, 特

别是与胚胎发育相关基因的功能, 如当切除鸡胚翅芽后缘的极化区, 然后移植到另一个翅芽的前端, 结果在翅芽的前端部位可形成一只额外的指趾^[13]。意想不到的, 如果将视黄酸颗粒移植到翅芽的前端区域也可诱导形成镜像指趾^[14], 从而揭示了视黄酸可启动编码控制指趾数目和方式的一系列信号分子基因的级联表达。虽然胚胎发育过程中的一些重要基因并不是在鸡胚中发现, 但是鸡胚模型常常首先考虑用来测试基因功能, 如同源异型基因*Hox*基因控制翅芽形成方式的作用就是在鸡胚实验中证实的。当通过逆转录病毒将*Hox*家簇的5'端基因导入鸡胚翅芽位置, 可形成多余的指趾和/或诱导指趾形态变化^[15]。*Shh*基因参与脊椎动物早期发育中细胞命运和胚胎范型的决定。鸡胚模型在剖析*Shh*基因功能时起到了很关键的作用, 如在鸡胚发育过程中, 肢体的极化区、脊索和神经板、亨氏节、前脑和中脑边界等区域形成过程中的信号转导系统中有*Shh*基因的表达, 并且显示*Shh*基因在肢体形成过程中可充当极化信号^[16]和调控*Gli1*、*Gli2*和*Gli3*基因的表达, 活化的*Gli1*基因的过表达又可诱导*Shh*靶基因的表达^[17, 18]。随着鸡基因组序列确定这一重大突破, 鸡胚模型再次被证实为发育生物学研究领域中的一个特殊模型, 用于测试基因功能。

2 鸡胚在哺乳动物胚胎培养体系中的应用进展

利用孵化鸡胚羊膜腔液体含有丰富的营养物质, Blackwood等^[19, 20]在无壳培养的4日龄鸡胚的羊膜腔内成功地牛、山羊和小鼠的合子期胚胎培养到囊胚, 并且囊胚率高于加有胎牛血清的Ham's F-10培养基培养的早期胚胎; 但是, 一个鸡胚培养只能支持3d, 如要培养6—7d, 就要用两个鸡胚, 这涉及繁杂的胚胎转移, 因而不适宜大规模应用。后来有学者将发育中鸡胚的羊膜腔液体抽出作为胚胎培养液的组份, 均能很好地支持动物胚胎发育^[21, 22]。随着各种限定培养基的优化应用, 现已不再使用此方法培养动物早期胚胎。

3 鸡胚在肿瘤学方面的研究应用进展

一般选用孵化第5—9d的活鸡胚进行肿瘤实验研究。鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)是常用的实验材料。CAM是由胚龄4—5d绒毛膜体壁中胚层和尿囊膜脏层中胚层融合而成, 其组织学结构有三层: 外胚层, 位于壳膜下方, 由绒毛膜上皮组成; 中胚层, 富含毛细血管的结缔组织; 内胚层, 位于尿囊, 由尿囊膜内皮形成。第6—7d的CAM及其血管覆

盖了整个卵黄囊表面,且随着胚龄的增加而增大,毛细血管极其丰富。再加上 CAM 是天然免疫缺陷宿主,并可耐受一定的温度变化,有利于检测某些对温度敏感的肿瘤细胞的生物学行为。所以, CAM 模型常作为移植性肿瘤的实验模型之一,也可作为肿瘤新生血管形成、肿瘤侵袭和远处脏器转移潜能,以及抗肿瘤药物作用机制探讨等方面研究的体内实验模型^[23],如将新鲜成釉细胞瘤组织接种于鸡胚绒毛尿囊膜上,通过对接种后不同时期的病理切片观察以了解成釉细胞瘤的侵袭生长特点,从而成功建立成釉细胞瘤的 CAM 侵袭模型^[24]。将人结肠癌细胞系 HT-29 种植到鸡胚 CAM 上,通过实体显微镜、光学显微镜和免疫细胞化学染色观察尿囊膜形成的血管特征,以及进一步观察促血管生成素-2 抗体对血管形成和肿瘤生长的影响。结果发现肿瘤细胞在种植后的 3—7d 生长迅速,且在肿瘤内部有新的血管形成。给予促血管生成素-2 抗体 5d 后,血管的数量明显减少,微血管密度降低明显。由此得出,促血管生成素-2 抗体可抑制人结肠癌细胞系 HT-29 诱导的血管生成,可应用于结肠癌的临床治疗^[25]。

4 鸡胚在与血管发生相关领域的研究应用进展

血管发生是胚胎发育的一项基本特征,或存在于某些特定的生理或病理条件下,如前面所提到的在肿瘤的生长和转移过程中外,还存在于风湿性关节炎、银屑病、糖尿病性视网膜病变和老年性黄斑变性等病理生理过程中。因此,利用 CAM 血管丰富的特点,应用 CAM 模型可研究影响血管发生的相关因素^[26],有效地评价不同药物的抑制血管生成的作用^[27,28],如对于湿性老年性黄斑变性的一项治疗措施就是使视网膜下新生血管闭塞,可运用鸡胚 CAM 作为湿性老年性黄斑变性的血管化作用模型,观察两光子刺激的光敏疗法(two-photon excitation photodynamic therapy TPE-PDT)对微血管的闭塞作用^[29]。

虽然 CAM 模型在研究诱导和抑制血管生成方面是一项很重要的技术,但在应用中也存在着许多缺点,不能够很好地对血管化作用进行定量指标的评价。由此, Ejaz 等^[30]建立了一种三维立体 CAM 模型,通过图像探通技术测定不同血管超微结构的三维参数,能精确地量化孵化 4—13d 鸡胚 CAM 的正常脉管系统。运用这项技术可更好地评价不同药物的促进和抑制血管生成作用,并且可独立地评价人类癌症的预后。

5 鸡胚在药理学方面的研究应用进展

哺乳动物模型常常作为一种新药应用于临床前的评定,然而,一个有效的药物递送体系动物模型的建立很难,花费又高,又耗时。由于鸡胚模型易于操作,快速简单,花费较少,因此,利用鸡胚,特别是 CAM 可建立一个药物递送评定体系。根据鸡胚和 CAM 的结构特点,运用 CAM 血管作为药物递送载体,可评定药物的活性、毒性、生物相容性和确定药代动力学特征,且此模型正逐渐成为制药研究的常规模型^[31]。

6 鸡胚在微生物学方面的研究应用进展

由于鸡胚来源充足,操作简便,本身很少带病毒,通常又是无菌的,对接种的病毒等不产生抗体,且鸡胚为正在发育的机体,有神经血管分布,其组织分化程度低,故常用来作为人类与动物病毒和立克次体的培养体系^[32]。接种的方法有尿囊腔、羊膜腔、卵黄囊接种和绒毛尿囊膜-壳块培养法,但鸡胚培养法本身也有一定的缺点,如一般的病毒通常不使鸡胚产生特异性的感染指征;卵黄中常常含有抗家禽病原体的母体抗体;某些细菌、衣原体和病毒能够从感染的母鸡传递到鸡胚;通常鸡胚常常含有白血病病毒。因此,自 20 世纪 50 年代细胞培养开始广泛地应用于病毒培养后,鸡胚只是用于流感病毒、痘病毒及疱疹病毒的分离培养与鉴定。

7 鸡胚在其他领域的研究应用进展

鸡胚模型除在发育生物学、肿瘤学、药理学等方面可作为一个理想的实验模型外,还可利用 CAM 本身的结构特点,用来测试生物材料在体内的反应,如对于有完全性房室传导阻滞的患者,往往要安装人工心脏起搏器,而这种传感器在体内的寿命比较短,其主要原因是植入材料所引起的炎症反应和纤维化,以及传感器组件的失灵。因此,当一种新的生物传感器研发出来后,往往要进行体内检测实验。而应用发育中鸡胚 CAM 作为一种新的检测生物材料和传感器在体内作用模型,具有简单易行的优势,并且结果显示, CAM 对生物材料的组织反应与哺乳动物相似,且随实验材料的不同而不同^[33,34]。

另外,由于鸡胚整胚、器官组织和细胞都可在体外培养,因此鸡胚材料除可用于体内实验外,还可应用于体外实验。

8 结语

鸡胚由于发育过程清楚, CAM 血管丰富,因

此, 根据鸡胚本身的结构特点, 结合现代实验操作技术, 鸡胚模型可广泛应用于发育生物学、肿瘤学、免疫学、药理学等相关领域的研究。鸡胚模型与其他动物模型相比, 具有来源方便、经济实用、易于操作、可同时进行大样本实验观察等优点, 具有重要的实验价值。

[参 考 文 献]

- [1] Stern CD, Conrad H. Waddington's contributions to avian and mammalian development, 1930-1940. *Int J Dev Biol*, 2000, 44(1): 15-22
- [2] Creuzet S, Couly G, Le Douarin NM. Patterning the neural crest derivatives during development of the vertebrate head: insights from avian studies. *J Anat*, 2005, 207(5): 447-59
- [3] Hatada Y, Stern CD. A fate map of the epiblast of the early chick embryo. *Development*, 1994, 120(10): 2879-89
- [4] Fraser S, Keynes R, Lumsden A. Segmentation in the chick embryo hindbrain is defined by cell lineage restrictions. *Nature*. 1990, 344(6265): 431-5
- [5] Altabef M, Clarke JD, Tickle C. Dorso-ventral ectodermal compartments and origin of apical ectodermal ridge in developing chick limb. *Development*, 1997, 124(22): 4547-56
- [6] Vargesson N, Clarke JD, Vincent K, et al. Cell fate in the chick limb bud and relationship to gene expression. *Development*, 1997, 124(10): 1909-18
- [7] Yang X, Dormann D, Münsterberg AE, et al. Cell movement patterns during gastrulation in the chick are controlled by positive and negative chemotaxis mediated by FGF4 and FGF8. *Dev Cell*, 2002, 3(3): 425-37
- [8] Kulesa PM, Kasemeier-Kulesa JC, Teddy JM, et al. Reprogramming metastatic melanoma cells to assume a neural crest cell-like phenotype in an embryonic microenvironment. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(10): 3752-7
- [9] Oppitz M, Busch C, Schriek G, et al. Non-malignant migration of B16 mouse melanoma cells in the neural crest and invasive growth in the eye cup of the chick embryo. *Melanoma Res*, 2007, 17(1): 17-30
- [10] Pochampally RR, Neville BT, Schwarz EJ, et al. Rat adult stem cells (marrow stromal cells) engraft and differentiate in chick embryos without evidence of cell fusion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(25): 9282-5
- [11] Goldstein RS. Transplantation of human embryonic stem cells to the chick embryo. *Methods Mol Biol*, 2006, 331: 137-51
- [12] Sigurjonsson OE, Perreault MC, Egeland T, et al. Adult human hematopoietic stem cells produce neurons efficiently in the regenerating chicken embryo spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(14): 5227-32
- [13] Tickle C. The early history of the polarizing region: from classical embryology to molecular biology. *Int J Dev Biol*, 2002, 46(7): 847-52
- [14] Tickle C, Lee J, Eichele G. A quantitative analysis of the effect of all-trans-retinoic acid on the pattern of chick wing development. *Dev Biol*, 1985, 109(1): 82-95
- [15] Morgan BA, Izpisua-Belmonte JC, Duboule D, et al. Targeted misexpression of *Hox-4, 6* in the avian limb bud causes apparent homeotic transformations. *Nature*, 1992, 358(6383): 236-9
- [16] Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, et al. *Sonic hedgehog* mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell*, 1993, 75(7): 1401-16
- [17] Marigo V, Johnson RL, Vortkamp A, et al. *Sonic hedgehog* differentially regulates expression of *GLI* and *GLI3* during limb development. *Dev Biol*, 1996, 180(1): 273-83
- [18] Sweetman D, Rathjen T, Jefferson M, et al. FGF-4 signaling is involved in mir-206 expression in developing somites of chicken embryos. *Dev Dyn*, 2006, 235(8): 2185-91
- [19] Blakewood EG, Jaynes JM, Johnson WA, et al. Using the amniotic cavity of the developing chick embryo for the in vivo culture of early-stage mammalian embryos. *Poult Sci*, 1989, 68(12): 1695-702
- [20] Blakewood EG, Pool SH, Prichard JF, et al. Culturing two-to eight-cell caprine embryos using domestic chicken eggs. *Mol Rep Dev*, 1990, 27(4): 288-94
- [21] Ocampo MB, Ocampo LC, Suzuki K, et al. Development to the blastocyst stage of pig embryos cultured in the amniotic fluid of developing chick embryos. *J Vet Med Sci*, 1993, 55(5): 889-91
- [22] Esmaili F, Rezazadeh Valojerdi M. Effect of six-and ten-day-old chick embryo amniotic fluid on development of two-cell mouse embryos. *Exp Anim*, 2004, 53(5): 453-6
- [23] Deryugina EI, Quigley JP. Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. *Histochem Cell Biol*, 2008, 130(6): 1119-30
- [24] 张磊涛, 黄洪章, 唐海阔, 等. 成釉细胞瘤的鸡胚绒毛尿囊膜侵袭模型的建立. *现代口腔医学杂志*, 2007, (1): 10-2
- [25] Wang HL, Deng CS, Yuan YF, et al. Effects of anti-angiopoietin-2 antibody on vascularization of an implanted model of human colonic carcinoma on chick embryo. *Chn J Gastroint Surg*, 2007, 10(3): 278-80
- [26] Richardson M, Singh G. Observations on the use of the avian chorioallantoic membrane (CAM) model in investigations into angiogenesis. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*, 2003, 3(2): 155-85
- [27] Domenico R, Angelo V, Luisa R, et al. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for *in vivo* research on anti-angiogenesis. *Curr Pharma Biotech*, 2000, 1(1): 73-82
- [28] 许杨, 潘瑞乐, 常琪, 等. 龙葵抑制鸡胚绒毛尿囊膜血管新生的研究. *中国中药杂志*, 2008, 33(5): 549-52
- [29] Samkoe KS, Clancy AA, Karotki A, et al. Complete blood vessel occlusion in the chick chorioallantoic membrane using two-photon excitation photodynamic therapy: implications for treatment of wet age-related macular degeneration. *J Biomed Opt*, 2007, 12(3): 034025
- [30] Ejaz S, Chekarova I, Ashraf M, et al. A novel 3-d model of chick chorioallantoic membrane for ameliorated studies in angiogenesis. *Cancer Invest*, 2006, 24(6): 567-75
- [31] Vargas A, Zeisser-Labouèbe M, Lange N, et al. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the *in vivo* evaluation of drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007, 59(11): 1162-76
- [32] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 780-1
- [33] Valdes TI, Kreutzer D, Moussy F. The chick chorioallantoic membrane as a novel *in vivo* model for the testing of biomaterials. *J Biomed Mater Res*, 2002, 62(2): 273-82
- [34] Valdes TI, Klueh U, Kreutzer D, et al. Ex ova chick chorioallantoic membrane as a novel *in vivo* model for testing biosensors. *J Biomed Mater Res A*, 2003, 67(1): 215-23