

肿瘤血管生成研究方法进展

王浩, 金焰, 吴楠

Advances in Research Methods of Tumor Angiogenesis

WANG Hao, JIN Yan, WU Nan

Key Laboratory of Preservation of Human Genetic Resources and Disease Control in China(Harbin Medical University), Ministry of Education, Laboratory of Medical Genetics, Harbin Medical University, Harbin 150081, China

Corresponding Author: WU Nan, E-mail: wunan@hrbmu.edu.cn

Abstract: Nowadays, angiogenesis has gradually become one of the most popular research directions of cancer since Jodah Folkman put forward a theory about that tumor development needs angiogenesis. Meanwhile, relevant research methods are enriched step by step. In this paper, we have made a systematic review to provide methodological references for subsequent studies about tumor angiogenesis and antiangiogenic therapy.

Key words: Tumor; Angiogenesis; Neovascularization

Funding: National Natural Science Foundation of China (No. 82172353); Hei Long Jiang Postdoctoral Foundation (No. LBH-TZ2020); China Postdoctoral Science Foundation (No. 2020T130159); Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (No. YQ2022H004); Foundation of Heilongjiang Province Scientific Research Institute (No. CZKYF2021-2-B012)

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

摘 要: 自二十世纪七十年代Jodah Folkman提出肿瘤发展与血管生成相关的理论后, 血管生成逐渐成为肿瘤领域的研究热点, 并伴随着血管生成研究方法的蓬勃发展, 本文对目前血管生成相关研究方法

及进展进行了系统性综述, 为后续肿瘤血管及肿瘤抗血管生成治疗相关研究提供方法学参考。

关键词: 肿瘤; 血管生成; 新生血管

中图分类号: R331; R73-5

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



0 引言

肿瘤的无限增殖能力, 使其对营养物质和氧气的需求加强, 当现有的血管无法满足肿瘤生长时, 就需要形成新的血管以获取所需。目前研究大多数将肿瘤分为无血管与有血管两个阶段: 在无血管期(直径<3 mm), 肿瘤从其邻近组织获取营养物质, 并在邻近组织简单扩散; 而当进入有血管期(直径≥3 mm)后, 肿瘤进展加快, 体积

迅速增大, 转移及侵袭能力迅速增强。肿瘤的发生、发展及转移与血管生成密切相关。因此, 研究肿瘤血管生成的原因、现象及机制对于肿瘤防治十分重要, 其中血管生成研究方法作为血管生成相关研究的方法学支撑, 占据重要地位^[1]。

1 肿瘤血管生成的研究方法

在进行肿瘤血管生成研究时, 细胞功能学方面可评估血管内皮细胞的增殖、迁移能力; 形态学方面可评估形成的血管长度、面积、微血管密度、分支点数量、萌芽数量等表型的改变; 血管整体功能方面可评估血管渗透、灌注、缺氧、黏附连接、成熟度来进行定量分析, 多方面综合评估血管生成能力^[2]。目前, 众多血管生成实验并不仅仅只对单一评价指标进行测量, 在选择实验时可根据实验目的及实验条件参考表1进行适当的组合选择。

1.1 内皮细胞功能实验

细胞迁移实验包括博伊登小室实验与划痕实验, 是实验室常用测定细胞迁移能动性的主力军。经过长期的发展, 两种实验已具备十分成

收稿日期: 2023-02-01; 修回日期: 2023-05-05

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82172353); 黑龙江省博士后特别资助项目(LBH-TZ2020); 中国博士后科学基金特别资助项目(2020T130159); 黑龙江省自然科学基金项目(YQ2022H004); 黑龙江省省属科研院所科研业务费项目(CZKYF2021-2-B012)

作者单位: 150081 哈尔滨, 中国遗传资源保护与疾病防控教育部重点实验室(哈尔滨医科大学), 哈尔滨医科大学医学遗传学研究室

通信作者: 吴楠(1988-), 女, 博士, 副教授, 主要从事肿瘤细胞双微体基因组与肿瘤标志物开发相关研究, E-mail: wunan@hrbmu.edu.cn, ORCID: 0000-0002-7401-4136

作者简介: 王浩(1997-), 男, 硕士在读, 主要从事肿瘤标志物相关研究, ORCID: 0009-0007-8466-8516

熟、标准化的实验流程及设备,使实验显得更加简单、精确,并在可重复性与高通量作业上得到了显著的提升^[3]。在此基础上,随着具有孵育模块的延时录像显微镜^[4]及计算机图像算法^[5-6]的发展,出现了随机迁移实验,不再拘泥于分析终点数据或图像,而是可以在细胞迁移过程中进行实时动态分析,并可从中获取单个细胞的轨迹以及其迁移的关键参数,如速度、方向、方向持续性等。经Visweshwaran对实验技术的优化,该实验已可在三维层面进行^[7],所得结果较二维平面可能会具有更高的预测价值。

目前已有大量细胞增殖实验方式,可根据不同评估标准或实验目的对实验方式进行择优选择。其中,细胞计数是测量细胞增殖最直接的方法之一,也被认为是衡量增殖的金标准。另外也可通过检测细胞代谢活性、细胞内ATP含量或利用细胞增殖标志物、DNA labeling等来间接反应细胞的增殖能力,常用方法包括CCK-8^[8]、MTT法^[9]、流式细胞术^[10]或Fucci技术^[11]等。但其实验方式大多对细胞具有一定的损伤,在实验选用时需注意每种实验的特性。此外,目前已经开发完成不同原理的具有无标记、自动化、实时、无损的细胞监测平台,如Agelent公司的xCELLigence RTCA和Nikon公司出品的Eclipse Ti2-E等。

1.2 血管形态实验

小管形成实验是一种经典模拟人体内血管生成过程的实验,操作性强、简单快捷、利于大规模实验,是目前被各实验室广泛用以研究血管生成的基础实验方法。原理是将原代人脐静脉内皮细胞静态培养在基质胶上,利用内皮细胞的成管能力形成管腔型结构,后经电子显微镜或免疫荧光成像后结

合图像分析软件对血管生成的长度、数量、分支点数量及面积等进行分析。在进行实验时值得注意的是,内皮细胞并不是唯一具有成管能力的细胞,在与其他细胞共培养时要注意区分^[3,12]。

胶原管腔实验是在小管形成实验基础上优化改进后,更进一步还原体内三维组织状态的血管生成实验^[12]。其最初是利用胶原夹心法将内皮细胞种植于两胶原中,但由于其实验方式,管腔无法随机在三维环境中形成,不能充分模拟三维环境。随后经过改进,将单个内皮细胞随机包埋在基质胶中,并加入所必须的生长因子,如血管内皮细胞生长因子(VEGF)、成纤维细胞生长因子(FGF-2)等^[13]。所得结果正如前文所提,较于二维平面实验更加具有预测价值,并且所形成的管腔更加完整、边界更加清晰,有利于随后的分析。纤维蛋白珠实验是一种可以形成三维血管样结构的实验方法。其原理是将内皮细胞铺在一种纤维蛋白凝胶珠上,再将其嵌入基质胶中,以促进内皮细胞在三维空间中成管。随后利用显微镜结合图像分析软件对单个珠子的血管生成进行评估,量化萌芽数量、长度、吻合支数量等。相较于传统的小管形成实验中所形成的二维网状血管结构而言,其模拟的三维结构更接近于体内天然血管网络,且因内皮细胞种植于珠子表面,在一定程度上也模拟了血管单层内皮细胞的结构^[14]。

视网膜外植体培养实验是一种完整、快速提取新生小鼠视网膜用以评估和量化发育中的血管对药物、抑制剂或某种物质反应的技术。该实验允许在体外生理环境中急性刺激或抑制内皮细胞的细胞功能,是一种易于管理和高度灵活的实验方式,不仅可用以量化评估血管生成数量、长度

表1 血管生成实验适用指标

Table 1 Applicable index of angiogenesis experiment

Experiment	Vascular morphology			Vascular function			
	Length/Area/ Branch point/Quantity	Sprout	Microvessel density	Permeability	Perfusion	Adhesion	Maturity degree
Tube formation assay	√						
Collagen lumen assay	√						
Fibrin bead assay	√	√					
Retinal explant assay	√	√	√				
Murine allantois assay	√		√				
Aortic ring assay	√	√					
Corneal angiogenesis assays	√						
Chorioallantoic membrane assays	√		√				
Matrigel plug assay	√		√	√	√		
Vascularized micro-organ platform	√		√	√	√		
Co-culture spheroids	√	√	√			√	√
Animal tumor model	√		√	√	√	√	√

等,也可用来在血管生成萌发的复杂场景中,探索内皮细胞中尖端细胞表型运动的分子机制。同样可以通过转基因供体小鼠或者通过慢病毒、CRISPR-Cas9技术处理视网膜以进行基因层面的研究。由于视网膜取出后生理环境的改变或物理干扰及损伤,通常会导致血管系统退化或细胞死亡增加,因此并不适宜长时间培养观察^[2,15]。

小鼠尿囊膜实验是将尿囊膜从小鼠胚胎分离后,培养至体外以研究血管生成能力的一种实验方式。与视网膜外植体培养实验有所不同的是,血管生成始于远端尿囊,对哺乳动物的胎盘血管化起重要作用,该实验为研究原始血管丛的重塑、血管生成的萌芽以及壁细胞募集导致的毛细血管网络的成熟等特性提供了强有力的工具。但该实验中,尿囊膜培养存活时间较短,并且需要实验人员具有扎实的处理胚胎小鼠的经验^[16]。

主动脉环实验源于二十世纪八十年代,目前被广泛用于研究血管生成基本机制和测试促/抗血管生成化合物的效果。该实验是将大/小鼠的主动脉取出后剪为血管环,植入基质胶或三维水凝胶中,在体外模拟血管生成,对血管生成萌发、分支等进行评价。与其他血管生成实验或模型相比,主动脉环实验的天然内皮细胞在培养过程中更接近于体内生理状态,保留了其原有生理特性。但其与视网膜外植体培养相似,可能会因外部原因造成损伤。另外,在进行免疫组织化学染色时,凝胶厚度对于抗体的穿透性至关重要,需谨慎选择^[17]。

角膜血管生成实验由Folkman团队提出,利用兔角膜的解剖学特征建立了体内血管生成系统。原理是将肿瘤细胞或组织样本、血管生成诱导因子等引入角膜产生的微囊中,用裂隙灯立体显微镜进行一定时间的观察并采集图像,以评估血管生成能力。此后,该实验进一步拓展至啮齿动物(小鼠和大鼠)上,相较于兔子而言,成本较低且可结合基因工程鼠模型来研究特定的分子相关性。但由于体型较小,操作难度有所提升,而在兔子中,实验更易操作^[18-19]。

鸡胚绒毛尿囊膜实验长久以来一直是研究哺乳动物的经典模型,目前也被广泛用于血管生成研究。其实验方案已有众多变化,但基本原理大致相同^[20]。经典实验方式是将孵化的鸡蛋上制作一个窗口,通过该窗口将待测成分放置于鸡胚尿囊膜上,重新封窗之后定期检查并测量结果。在评估血管生成时,其量化标准是高度可变的,要

获得统计学意义需要多个样本。目前,已开发出多种用于血管评估的方法,包括注射荧光示踪剂、MRI、血管铸型和PET成像等^[21]。此外,已发展出人造蛋壳,结合特殊的微流控小室,使血管评估和动力学研究更加便捷可靠^[22]。

1.3 血管功能实验

基质胶栓实验是在动物皮下空间注射由基质胶混合药物或测试因子形成栓子,使血管生长至栓子内一段时间后取出进行分析^[23]。由于基质胶的光学半透明性和高渗透性,该实验非常适合与各种荧光标记技术结合和3D图像的生成,可用于小管形成、血管渗透性等各类血管生成能力评估。其在血管生成实验中相对用途广、成本低、操作简便,大多数实验室均可实现。但仍需注意动物的选择、基质胶的处理等。与基质胶栓实验相似的还有海绵植入实验^[24]、圆盘血管生成系统^[25]及海绵-基质胶实验,都是将不同类型的材料混合待测因子植入实验动物体内来获取结果。

血管化微器官平台(vascularized micro-organ platform, VMO)是一种利用微流控技术在三维基质中形成可灌流血管网络的技术。多采用聚二甲基硅氧烷(PDMS)制成一种具有多通道的透明实验平台,利用微流控技术形成高压和低压微血流通道,利用其压力差在血管生成或发育中驱动物质流通凝胶基质,诱导血管生成。与其他实验不同的是,VMO中内皮细胞暴露于流体力与剪切力下,其同样也是诱导血管生成的因素^[26]。VMO可以在整个血管形成过程中进行成像和定量特定的参数,如血管网络长度、分支和吻合支等,可进行实时测量,另外也可根据灌流不同分子量的葡聚糖来测定血管渗透性^[27-29]。

内皮细胞共培养球体是将肿瘤细胞与内皮细胞共培养的一种模拟体内环境的研究方法。对分析内皮细胞与肿瘤间质或实质之间相互作用、血管生成能力等研究都具有宝贵的价值。该方法操作性、灵活性极强,可结合其他血管生成研究方法进行组合研究。球体的产生方式有很多种,如悬滴法、磁悬浮法、悬浮培养法等。在进行实验时,细胞的选择和培养基的选用十分重要,不同细胞的配对组合对结果的产生具有决定性的作用,而选用的培养基需要能够为每种类型的细胞提供足够的营养,又不会过度刺激细胞产生增殖^[30-31]。

动物肿瘤模型在肿瘤研究中已经广泛普及,拥有众多类型,在肿瘤血管生成中也具有相当多

的选择。目前, 常见模型包括转基因肿瘤小鼠模型、斑马鱼模型、爪蟾蝌蚪模型等。其中, 小鼠模型是目前实验室中较为常见的实验模型, 其成瘤方法及检测手段较为成熟, 如人源肿瘤异种移植模型、基因工程小鼠模型和自发及诱发性肿瘤模型。斑马鱼和爪蟾蝌蚪模型在肿瘤血管生成研究中同样具有相当突出的优点, 源于其透明特性, 利用转基因荧光报告系统标记血管后, 可轻松实现体内血管的可视化和评估^[32-34]。

动物模型对于评估血管生成能力是必不可少的一环, 其为研究肿瘤血管生成提供更接近人体内的生理环境, 结合活体成像技术^[35-37], 特异性标记技术等^[38], 可对血管生成能力进行有效的评估。

2 结语与展望

肿瘤的血管生成相关分子机制对肿瘤治疗、药物研发都具有十分重要的意义。目前来看, 血管生成相关实验虽有十足进展, 但仍然无法完美地模拟出体内的生理环境, 使其在不同条件下的实验结果具有易变性。在研究时, 单一实验无法对血管生成能力进行全面的评估, 需要结合多种实验来进行综合评定。相信随着高新技术的发展, 未来血管生成的研究环境会更趋近于体内环境, 实验方式会变得更加智能化、标准化、自动化, 得到更加准确、可靠的信息, 其实验手段也会更加简便、可靠。

利益冲突声明:

所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications[J]. *N Engl J Med*, 1971, 285(21): 1182-1186.
- [2] Lee JW, Hur J, Kwon YW, *et al.* KAI1(CD82) is a key molecule to control angiogenesis and switch angiogenic milieu to quiescent state[J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 148.
- [3] Dai G, Yang Y, Liu S, *et al.* Hypoxic Breast Cancer Cell-Derived Exosomal SNHG1 Promotes Breast Cancer Growth and Angiogenesis via Regulating miR-216b-5p/JAK2 Axis[J]. *Cancer Manag Res*, 2022, 14: 123-133.
- [4] Jain P, Worthylake RA, Alahari SK. Quantitative analysis of random migration of cells using time-lapse video microscopy[J]. *J Vis Exp*, 2012, (63): e3585.
- [5] Svensson CM, Medyukhina A, Belyaev I, *et al.* Untangling cell tracks: Quantifying cell migration by time lapse image data analysis[J]. *Cytometry A*, 2018, 93(3): 357-370.
- [6] Carpentier G, Berndt S, Ferratge S, *et al.* Angiogenesis Analyzer for ImageJ-A comparative morphometric analysis of "Endothelial Tube Formation Assay" and "Fibrin Bead Assay"[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 11568.
- [7] Visweshwaran SP, Gautreau A. Analysis of Random Migration of Cancer Cells in 3D[J]. *Bio Protoc*, 2020, 10(1): e3482.
- [8] Tang C, Lei X, Xiong L, *et al.* HMGA1B/2 transcriptionally activated-POU1F1 facilitates gastric carcinoma metastasis via CXCL12/CXCR4 axis-mediated macrophage polarization[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(5): 422.
- [9] Wang Q, Kumar V, Lin F, *et al.* ApoE mimetic peptide targeted nanoparticles carrying a BRD4 inhibitor for treating Medulloblastoma in mice[J]. *J Control Release*, 2020, 323: 463-474.
- [10] Tario JD Jr, Muirhead KA, Pan D, *et al.* Tracking immune cell proliferation and cytotoxic potential using flow cytometry[J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 699: 119-164.
- [11] Sakaue-Sawano A, Yo M, Komatsu N, *et al.* Genetically Encoded Tools for Optical Dissection of the Mammalian Cell Cycle[J]. *Mol Cell*, 2017, 68(3): 626-640. e5.
- [12] Montesano R, Orci L, Vassalli P. *In vitro* rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices[J]. *J Cell Biol*, 1983, 97(5 Pt 1): 1648-1652.
- [13] Davis GE, Kim DJ, Meng CX, *et al.* Control of vascular tube morphogenesis and maturation in 3D extracellular matrices by endothelial cells and pericytes[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1066: 17-28.
- [14] Nakatsu MN, Davis J, Hughes CC. Optimized fibrin gel bead assay for the study of angiogenesis[J]. *J Vis Exp*, 2007, (3): 186.
- [15] Sawamiphak S, Ritter M, Acker-Palmer A. Preparation of retinal explant cultures to study ex vivo tip endothelial cell responses[J]. *Nat Protoc*, 2010, 5(10): 1659-1665.
- [16] Starks RR, Alhasan RA, Kaur H, *et al.* Transcription Factor PLAGL1 Is Associated with Angiogenic Gene Expression in the Placenta[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 8317.
- [17] Duah E, Teegala LR, Kondeti V, *et al.* Cysteinyl leukotriene 2 receptor promotes endothelial permeability, tumor angiogenesis, and metastasis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(1): 199-204.
- [18] Rogers MS, Birsner AE, D'Amato RJ. The mouse cornea micropocket angiogenesis assay[J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(10): 2545-2550.
- [19] Morbidelli L, Ziche M. The Rabbit Corneal Pocket Assay[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1430: 299-310.
- [20] Ribatti D, Vacca A, Roncali L, *et al.* The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for *in vivo* research on angiogenesis[J]. *Int J Dev Biol*, 1996, 40(6): 1189-1197.
- [21] Kennedy DC, Coen B, Wheatley AM, *et al.* Microvascular Experimentation in the Chick Chorioallantoic Membrane as a Model for Screening Angiogenic Agents including from Gene-Modified Cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23(1): 452.
- [22] Huang W, Itayama M, Arai F, *et al.* An angiogenesis platform using a cubic artificial eggshell with patterned blood vessels on

- chicken chorioallantoic membrane[J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0175595.
- [23] Kibbey MC, Corcoran ML, Wahl LM, *et al.* Laminin SIKVAV peptide-induced angiogenesis *in vivo* is potentiated by neutrophils[J]. J Cell Physiol, 1994, 160(1): 185-193.
- [24] Van de Velde M, García-Caballero M, Durré T, *et al.* Ear Sponge Assay: A Method to Investigate Angiogenesis and Lymphangiogenesis in Mice[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1731: 223-233.
- [25] Fajardo LF, Kowalski J, Kwan HH, *et al.* The disc angiogenesis system[J]. Lab Invest, 1988, 58(6): 718-724.
- [26] Campinho P, Vilfan A, Vermot J. Blood Flow Forces in Shaping the Vascular System: A Focus on Endothelial Cell Behavior[J]. Front Physiol, 2020, 11: 552.
- [27] Nguyen DH, Stapleton SC, Yang MT, *et al.* Biomimetic model to reconstitute angiogenic sprouting morphogenesis *in vitro*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(17): 6712-6717.
- [28] van Duinen V, Zhu D, Ramakers C, *et al.* Perfused 3D angiogenic sprouting in a high-throughput *in vitro* platform[J]. Angiogenesis, 2019, 22(1): 157-165.
- [29] Liu Y, Sakolish C, Chen Z, *et al.* Human *in vitro* vascularized micro-organ and micro-tumor models are reproducible organ-on-a-chip platforms for studies of anticancer drugs[J]. Toxicology, 2020, 445: 152601.
- [30] Franchi-Mendes T, Lopes N, Brito C. Heterotypic Tumor Spheroids in Agitation-Based Cultures: A Scaffold-Free Cell Model That Sustains Long-Term Survival of Endothelial Cells[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9: 649949.
- [31] Vorwald CE, Joshee S, Leach JK. Spatial localization of endothelial cells in heterotypic spheroids influences Notch signaling[J]. J Mol Med (Berl), 2020, 98(3): 425-435.
- [32] Baltrunaite K, Craig MP, Desai SP, *et al.* ETS transcription factors Etv2 and Flilb are required for tumor angiogenesis[J]. Angiogenesis, 2017, 20(3): 307-323.
- [33] Noishiki C, Yuge S, Ando K, *et al.* Live imaging of angiogenesis during cutaneous wound healing in adult zebrafish[J]. Angiogenesis, 2019, 22(2): 341-354.
- [34] Fujiwara M, Hasebe T, kajita M, *et al.* RCAN1 regulates vascular branching during *Xenopus laevis* angiogenesis[J]. J Vasc Res, 2011, 48(2): 104-118.
- [35] Kirkpatrick ND, Chung E, Cook DC, *et al.* Video-rate resonant scanning multiphoton microscopy: An emerging technique for intravital imaging of the tumor microenvironment[J]. Intravital, 2012, 1(1): 10.4161/intv.21557.
- [36] Bruns OT, Bischof TS, Harris DK, *et al.* Next-generation *in vivo* optical imaging with short-wave infrared quantum dots[J]. Nat Biomed Eng, 2017, 1: 0056.
- [37] Farrar CT, Kamoun WS, Ley CD, *et al.* *In vivo* validation of MRI vessel caliber index measurement methods with intravital optical microscopy in a U87 mouse brain tumor model[J]. Neuro Oncol, 2010, 12(4): 341-350.
- [38] Meng X, Yang R, Zhao S, *et al.* Associations between tumor grade, contrast-enhanced ultrasound features, and microvascular density in patients with clear cell renal cell carcinoma: a retrospective study[J]. Quant Imaging Med Surg, 2022, 12(3): 1882-1892.

[编辑：黄园玲；校对：杨卉]

作者贡献：

王 浩：收集资料及文献、撰写文章
金 焰：提出选题、提供基金支持
吴 楠：指导文章书写及修订文章