文章编号:1000-5404(2009)16-1585-04

论著

宫颈癌淋巴道转移模型的建立及 Prox-1 临床意义初探

李兰双,胡丽娜 (重庆医科大学附属第二医院妇产科,重庆 400010)

摘 要:目的 建立小鼠宫颈癌淋巴道转移模型,初步探讨 Prox-1 的临床意义。**方法** 将宫颈癌 U27 瘤株的单细胞悬液注入小鼠左爪垫,观察成瘤率、肿瘤生长及淋巴结转移情况。应用 HE 染色及 CK 免疫组化检测各级淋巴结中有无肿瘤转移;应用荧光定量 PCR 和 Western blot 检测肿瘤组织中 VEGFR-3 和 Prox-1 在 mRNA 及蛋白水平的表达情况。**结果** 爪垫种植后成瘤率 100%;淋巴结转移程度与接种时间显著相关;荧光定量 PCR 和 Western blot 结果显示,肿瘤组织中 Prox-1 mRNA 和蛋白在远处淋巴结转移组[(0.000 173 ± 0.000 085),(0.108 7 ± 0.049 9)]明显高于前哨淋巴结转移组[(0.000 058 ± 0.000 022),(0.012 0 ± 0.005 7)]及无淋巴结转移组[(0.000 027 ± 0.000 010),(0.003 8 ± 0.001 4)],3 组两两比较差异有统计学意义($P<0.05$),而 VEGFR-3 的 mRNA 和蛋白在前哨淋巴结组分别为(0.000 147 ± 0.000 066)和(0.123 6 ± 0.054 8),与远处淋巴结转移组[(0.000 224 ± 0.000 100),(0.160 7 ± 0.075 3)]及无淋巴结转移组[(0.000 134 ± 0.000 044),(0.082 4 ± 0.043 2)]比较均无显著性差异($P>0.05$)。**结论** 小鼠爪垫皮下注射可成功建立宫颈癌淋巴道转移模型;Prox-1 是预测肿瘤淋巴结转移及抗肿瘤淋巴转移的敏感指标。

关键词: 宫颈癌;淋巴道转移;小鼠模型;VEGFR-3;Prox-1
中图法分类号: R73-354;R730.23;R737.33 **文献标识码:** A

Model establishment of cervical cancer lymphatic metastasis and clinical significance of Prox-1

LI Lan-shuang, HU Li-na (Department of Obstetrics and Gynecology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To establish the uterine cervical cancer model of lymphatic metastasis using Kunming (Km) mice and to explore the clinical significance of Prox-1. **Methods** The lymphatic metastasis model was established by injection of cervical cancer cells into the left nail pads of female Km mice. The tumor formation rate, tumor growth and lymph node metastasis status were observed. At 5, 10, 15, and 20 d after inoculation, mice in one group were sacrificed for the specimens, including lymph nodes and tumors. Then HE dyeing and immunohistochemistry staining of cytokeratin were used for the detection of the occurrence of lymphatic metastasis or not, and fluorescent quantitation polymerase chain reaction (FQ-PCR) and Western-blot were used for the detection of the expressions of VEGFR-3 and Prox-1. **Results** The tumor formation rate was 100%. The lymph node metastasis was closely correlated with the inoculation time. FQ-PCR and Western blot demonstrated that Prox-1 mRNA and protein expressions in distant lymphatic metastasis group [(0.000 173 ± 0.000 085) and (0.108 7 ± 0.049 9)] were significantly higher than those in sentinel node metastasis group [(0.000 058 ± 0.000 022) and (0.012 0 ± 0.005 7)] and non-lymphatic metastasis group [(0.000 027 ± 0.000 010) and (0.003 8 ± 0.001 4)] ($P<0.05$). Expressions of VEGFR-3 mRNA and protein in sentinel node metastasis group were 0.000 147 ± 0.000 066 and 0.123 6 ± 0.054 8, respectively, but no significant difference was found as compared with those in distant lymphatic metastasis group [(0.000 224 ± 0.000 101) and (0.160 7 ± 0.075 3)] and non-lymphatic metastasis group [(0.000 134 ± 0.000 044) and (0.082 4 ± 0.043 2)] ($P>0.05$). **Conclusion** The model for uterine cervical cancer lymphatic metastasis can be successfully established through the nail pad hypodermic in Km mice. It is an ideal model for the studies of the mechanisms in uterine cervical metastasis as well as antitumor therapy of lymphatic transfer. Prox-1 may be a sensitive index for the prediction of tumor lymph node metastasis and antitumor lymphatic transfer.

Key words: uterine cervical cancer; lymphatic metastasis; mice model; VEGFR-3; Prox-1

作者简介: 李兰双,女,河北省无极县人,博士研究生,主要从事妇科肿瘤方面的研究。E-mail: lixueliancq@126.com
通信作者: 胡丽娜,E-mail:cqhulina@126.com
收稿日期: 2008-11-17;**修回日期:** 2009-01-06

宫颈癌是妇女最常见的恶性肿瘤之一，淋巴道转移是宫颈癌侵袭远处器官的主要途径，也是影响患者预后至关重要的因素[1]。但由于缺乏相应的淋巴道转移模型，针对宫颈癌淋巴转移的机制研究和治疗措施都难以突破。本实验将宫颈癌 U27 的单细胞悬液接种于昆明小鼠（Kunming，Km）的爪垫皮下，建立了免疫功能正常小鼠宫颈癌淋巴道转移模型，并对肿瘤内 Prox-1 与肿瘤淋巴结转移之间的关系进行了初步探讨，旨在为研究宫颈癌的淋巴转移机制及抗肿瘤淋巴转移提供理想的动物模型和新的靶点。

1 材料与方法

1.1 宫颈癌淋巴转移模型的构建和标本收集

宫颈癌 U27 瘤株购自中国医学科学院基础医学细胞中心，雌性昆明小鼠由重庆医科大学实验动物中心提供，6～8 周龄，体质量 18～22 g。瘤株购回后以插块法传代，取对数生长期肿瘤以酶消化法制备 U27 瘤株的单细胞悬液，以 PBS 充分洗涤后，以 1×10^7 个细胞的数量接种于 Km 小鼠左爪垫皮下。应用随机数字表法分为 4 组，每组 10 只，观察荷瘤小鼠肿瘤生长及淋巴结情况。接种后 5、10、15、20 d 分别处死 1 组荷瘤小鼠，取左腘窝淋巴结、左腹股沟淋巴结、髂动脉旁及肾门淋巴结、肺脏和肝脏标本固定于 10% 中性福尔马林溶液，肿瘤组织放入液氮中保存。

1.2 淋巴结转移的判定

淋巴结标本常规石蜡包埋切片、HE 染色，细胞角蛋白免疫组化（兔抗鼠 cytokeratin 和山羊抗兔二抗分别为 Santa Cruz 和北京中杉产品，按免疫组化试剂盒说明书操作），病理科医生对切片进行双盲评价，根据淋巴结内癌细胞侵犯的程度分级如下，0 级：淋巴结内未见肿瘤细胞；1 级：淋巴结边缘窦中内见成堆肿瘤细胞；2 级：肿瘤细胞侵及淋巴结的中间窦和实质，甚至完全占据淋巴结。

1.3 小鼠淋巴转移的实验分组

按处死时淋巴结转移的程度将小鼠分为：无淋巴结转移组，前哨淋巴结转移组（仅有左腘窝淋巴结转移）和远处淋巴结转移组（有左腹股沟淋巴结或髂动脉旁及肾门淋巴结转移）3 组。

1.4 实时荧光定量 RT-PCR 方法检测 VEGFR-3 和 Prox-1 mRNA 表达

ABI7000 荧光定量 PCR 仪，Trizol 试剂、SYBR PrimeScript RT-PCR Kit 均购自大连宝生物工程有限公司，应用 Trizol 试剂提取各组肿瘤组织总 RNA，用 0.8% 琼脂糖和紫外分光光度计检测质量和纯度。分别取各组的总 RNA 各 2 μg，按 RT-PCR 试剂盒说明书逆转录合成 cDNA。实时荧光定量 PCR 扩增反应体系 20 μl：含有 SYBR Green Ⅰ的 SYBR Premix Ex *Taq*（2×）10 μl，正向引物和反向引物（10 μmol/L）各 0.4 μl，ROX Reference Ⅰ 0.4 μl，cDNA 模板 2 μl，去离子水 6.8 μl。扩增反应具体条件为：94 ℃热变性 10 s；94 ℃，5 s；60 ℃，31 s；40 个循环，在每一循环的退火阶段收集荧光进行实时检测。反应结束后先加热到 95 ℃，然后降至 55 ℃开始缓慢升温（0.2 ℃/s）至 95 ℃，记录荧光信号的变化，得出扩增产物的熔解曲线。分别得到目的基因 Prox-1、VEGFR-3 和内标基因 β-actin 的 Ct 值，求出△Ct（每个目标基因 Ct 值－内标基因 Ct 值），根据公式 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 进行计算，即得到各组间目标基因的表达量差异。

引物的设计与合成：β-actin、VEGFR-3 和 Prox-1 引物参照 GenBank 提供的序列，通过 Primer Primer 5.0 设计，由大连宝生物工程有限公司合成。引物序列及产物长度见表 1。

表 1 FQ-PCR 的引物序列及产物长度

待扩增基因	引物序列（5′→3′）	产物长度（bp）
β-actin	上游：GGGAAATCGTGCGTGACATCAA	187
	下游：CCCAAGAAGGAAGGCTGGAAAA	
Prox-1	上游：GTCCCACTGACTACGAAAC	127
	下游：CCACCCTCCATACCCATA	
VEGFR-3	上游：CATCAAGACGGGCTACCT	162
	下游：TCCACCACCTTCCCAAAA	

1.5 Western blot 检测 VEGFR-3 和 Prox-1 的蛋白表达

兔抗鼠 VEGFR-3 和 β-actin 为 Santa Cruz 产品，鼠抗 Prox-1 单克隆抗体为 CHEMICON 产品，山羊抗兔及兔抗鼠二抗为北京中杉产品。肿瘤组织按组提取总蛋白，标化后行 SDS-PAGE 及转膜、抗原抗体反应、ECL 显色、凝胶成像系统上摄像并分析，目标蛋白的含量＝样本目标蛋白灰度值/同一样本 β-actin 灰度值。

1.6 统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计软件进行 t 检验，计数资料采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 肿瘤生长情况

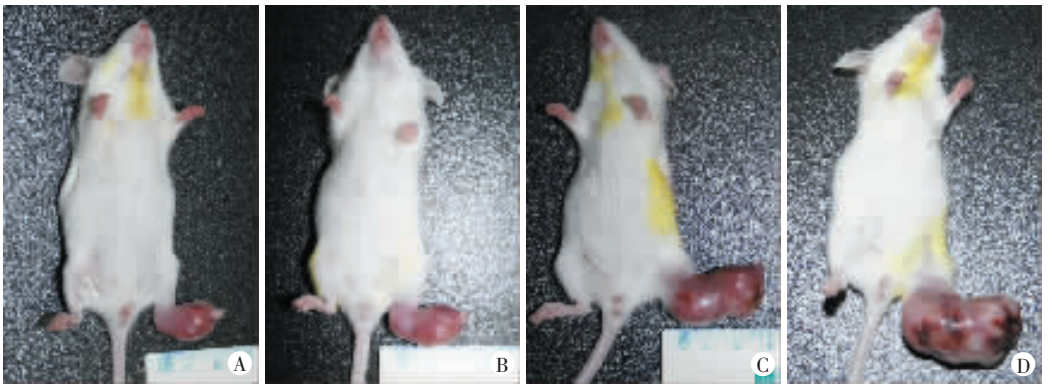
肿瘤细胞接种后在所有接种的小鼠爪垫均有肿瘤生长，成瘤率为 100%。在接种后不同时间测量肿瘤体积大小，见肿瘤体积随接种时间延长而逐渐增大（图 1）。

2.2 小鼠淋巴结转移情况比较

自接种后第 3 天即有部分小鼠可触及肿大的左腘窝淋巴结，第 5 天所有小鼠均可触及肿大的左腘窝淋巴结，随接种时间延长，左腹股沟淋巴结逐渐可及，质地变硬。HE 染色及细胞角蛋白免疫组化结果显示淋巴结转移程度与接种时间显著相关（表 2，图 2）。

2.3 肿瘤组织中 Prox-1 和 VEGFR-3 的 mRNA 水平与淋巴结转移的关系

荧光定量 PCR 检测结果显示，肿瘤组织中 Prox-1 mRNA 在无淋巴结转移组为（0.000 027 ± 0.000 010），前哨淋巴结转移组为（0.000 058 ± 0.000 022），远处淋巴结转移组为（0.000 173 ± 0.000 085）。说明肿瘤组织中 Prox-1 的 mRNA 水平随肿瘤淋巴结转移逐渐升高，3 组两两比较差异有统计学意义（$P<0.05$）；而肿瘤组织中 VEGFR-3 mRNA 在无淋巴结转移组、前哨淋巴结转移组和远处淋巴结转移组分别为（0.000 134 ± 0.000 044）、（0.000 147 ± 0.000 066）、（0.000 224 ± 0.000 101）。远处淋巴结转移组与无淋巴结转移组相比有显著性差异（$P<0.05$），而前哨淋巴结转移组与无淋巴结转移组和远处淋巴结转移组比较均无统计学差异（$P>0.05$）。



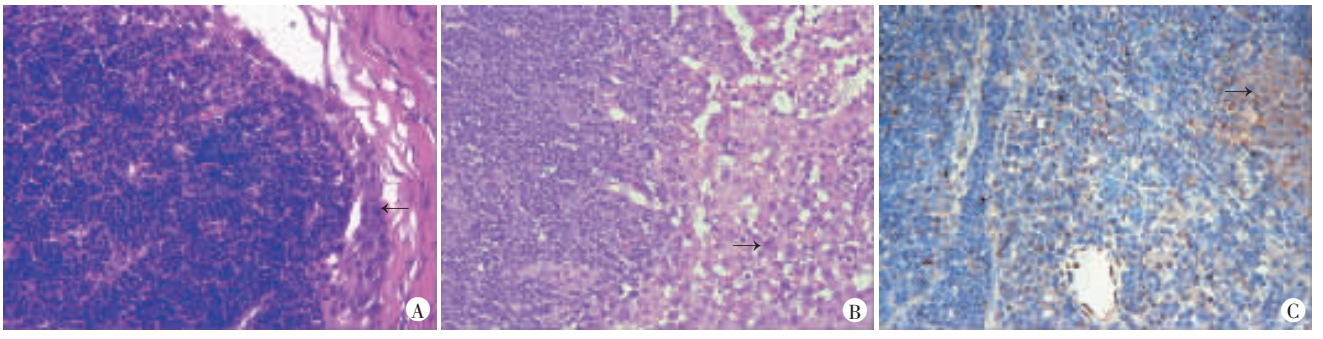
A～D:分别为接种第 5、10、15、20 天的荷瘤小鼠

图 1　接种后肿瘤生长情况

表 2　小鼠各级淋巴结转移情况

接种时间(d)	实验动物数(只)	转移动物数(只)	左腘窝淋巴结			左腹股沟淋巴结			髂动脉旁及肾门淋巴结		
			1 级(个)	2 级(个)	转移率(%)	1 级(个)	2 级(个)	转移率(%)	1 级(个)	2 级(个)	转移率(%)
5	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	10	5	4	1	50	1	0	10	0	0	0
15	10	10	3	7	100	3	1	40	0	0	0
20	10	10	0	9[a]	90	5	2	70	4	0	40

a: 1 只小鼠的左腘窝淋巴结与肿瘤组织融合,未取到淋巴结

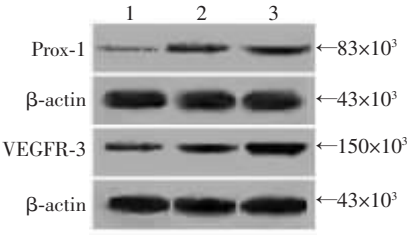


A:接种 10 d (HE×400)　↑: 腘窝淋巴结边缘窦内有成团癌细胞; B:接种 20 d (HE×400)　↑: 腘窝淋巴结中央被肿瘤细胞占据; C:接种 15 d CK 蛋白免疫组化观察(S-P×400)　↑: 腹股沟淋巴结皮质内有癌细胞团

图 2　Km 小鼠宫颈癌淋巴转移模型中的淋巴结转移情况

2.4　肿瘤组织中 Prox-1 和 VEGFR-3 的蛋白水平与淋巴结转移的关系

Western blot 结果表明,肿瘤组织中 Prox-1 和 VEGFR-3 在蛋白水平均随肿瘤淋巴结转移逐渐升高。VEGFR-3 的蛋白水平在远处淋巴结转移组(0.160 7±0.075 3)明显高于无淋巴结转移组(0.082 4±0.043 2),2 组比较有显著性差异($P<0.05$),但前哨淋巴结转移组(0.123 6±0.054 8)与远处淋巴结转移组和无淋巴结转移组分别比较差异均无统计学意义($P>0.05$);而对 Prox-1 而言,其蛋白质水平在无淋巴结转移组(0.003 8±0.001 4)、前哨淋巴结转移组(0.012 0±0.005 7)和远处淋巴结转移组(0.108 7±0.049 9)中依次增高,3 组中任意两者比较差异均有统计学意义($P<0.05$,图 3)。



1: 无淋巴结转移组; 2:前哨淋巴结转移组; 3:远处淋巴结转移组

图 3　各组小鼠肿瘤组织中 Prox-1 和 VEGFR-3 的蛋白水平

3　讨论

3.1　宫颈癌淋巴道转移模型的构建

淋巴道转移是宫颈癌侵袭远处器官的主要途径,

盆腔淋巴结转移又是影响患者治疗和预后的最重要因素。目前肿瘤淋巴道转移的研究模型多集中在乳腺癌[2]、直肠癌[3]及胃癌[4]上,没有针对宫颈癌的淋巴道转移模型。因此,本研究将宫颈癌 U27 的单细胞悬液注入 Km 小鼠爪垫皮下,利用其爪垫皮下有丰富的淋巴管,并呈单向性淋巴引流这一解剖学特性,构建宫颈癌淋巴道转移模型。结果表明,以酶消化法制备 U27 瘤株单细胞悬液,计数方便,可重复性高;随接种时间延长,转移的淋巴结数目增多,级别逐渐升高;淋巴结转移率高,早期淋巴结转移灶发生在移植瘤生长 5 d 后,可除外直接注入淋巴管的可能,同时提示淋巴结转移是由移植瘤原发部位不断补充瘤细胞的结果;受个体差异影响同组动物早期淋巴结转移存在差异。说明本模型是实用的、符合自然转移规律的淋巴道转移动物模型。其优势为:①Km 小鼠是封闭群远交系动物,其基因库大,基因杂合率高,更接近自然种属的特点使之有普遍的代表性,与临床实际更接近。②肿瘤局部生长便于观察及干扰因素处理。③操作简便可行且转移率高,可满足大批量实验和推广使用,是分析宫颈癌淋巴道转移机制抗淋巴道转移治疗的理想动物模型。

3.2 Prox-1 与宫颈癌淋巴结转移的关系

近年来淋巴管内皮细胞特异标记分子的发现,使淋巴管成为研究的新热点。VEGFR-3 是目前应用最多的淋巴管内皮细胞标志物[5],本研究应用荧光定量 PCR 和 Western blot 方法对宫颈癌移植瘤中 VEGFR-3 的表达进行了比较,结果发现如将小鼠按无/有淋巴结转移分为两组,则 VEGFR-3 在淋巴结转移组高于无淋巴结转移组,但两者无统计学差异,与 Gombos 等[6]的研究结果一致。但如将淋巴结转移组进一步分为前哨淋巴结转移组和远处淋巴结转移组,则会发现 VEGFR-3 在远处淋巴结转移组明显高于无淋巴结转移组,差异有显著性。分析原因可能与 VEGFR-3 在部分肿瘤血管内皮细胞表达有关。近期对表皮黑色素瘤[7]及胃癌[8]的临床资料分析表明,肿瘤内淋巴管可作为预测肿瘤淋巴结转移的指标及治疗靶点,同时也是判断患者预后的独立指标。

Prox-1 是目前淋巴内皮细胞最特异的谱系标记物,在成人组织和肿瘤中仅在淋巴管表达。Wigle 等[9]和 Hong 等[10]发现在胚胎发育过程中,主静脉一侧的内皮细胞中有未知的信号诱导 Prox-1 表达,使其分化、成熟、定型为淋巴内皮细胞并表现出其特异性。敲除 Prox-1 基因的小鼠完全没有淋巴管,同时也缺乏其他淋巴内皮标记物,如 VEGFR-3、LYVE-1 的共表达,而转染 Prox-1 基因后血管内皮细胞可定向分化为淋巴管内皮细胞表型。这说明 Prox-1 基因是控制淋巴管新生的独立调控基因,是淋巴管生成的“总开关”。本实验发现,肿瘤内 Prox-1 在无淋巴结转移组表达很低,在前哨淋巴结转移组表达即有明显升高,在远处淋巴结转移组则进一步升高,3 组两两比较差异有统计学意义,说明 Prox-1 在肿瘤淋巴结转移的早期即可出现明显升高,可作为预测肿瘤淋巴结转移的新指标和抗肿瘤淋巴结转移的新的靶点,可能对判断宫颈癌预后有一定意义。

综上所述,本实验成功构建了免疫功能正常小鼠的宫颈癌淋巴道转移模型,操作简单,转移率高,为进一步研究宫颈癌淋巴道转移机制,药物干预以及抗肿瘤淋巴转移治疗提供了一种较理想的动物模型。在此基础上,研究发现 Prox-1 可作为预测肿瘤淋巴结转移及抗肿瘤淋巴转移的敏感指标。

参考文献:

[1] 朱元方, 蔡丽萍, 陈贵美, 等. MRI 在宫颈癌临床分期中的应用探讨[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(10): 989 - 990.

[2] Pathak A P, Artemov D, Neeman M, *et al*. Lymph node metastasis in breast cancer xenografts is associated with increased regions of extravascular drain, lymphatic vessel area, and invasive phenotype[J]. Cancer Res, 2006, 66(10): 5151 - 5158.

[3] Sasaki T, Nakamura T, Rebhun R B, *et al*. Modification of the primary tumor microenvironment by transforming growth factor alpha-epidermal growth factor receptor signaling promotes metastasis in an orthotopic colon cancer model[J]. Am J Pathol, 2008, 173(1): 205 - 216.

[4] Iwata C, Kano M R, Komuro A, *et al*. Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses lymph node metastasis *via* reduction of lymphangiogenesis [J]. Cancer Res, 2007, 67(21): 10181 - 10189.

[5] Longatto-Filho A, Martins A, Costa S M, *et al*. VEGFR-3 expression in breast cancer tissue is not restricted to lymphatic vessels[J]. Pathol Res Pract, 2005, 201(2): 93 - 99.

[6] Gombos Z, Xu X, Chu C S, *et al*. Peritumoral lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor C expression in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(23): 8364 - 8371.

[7] Massi D, Puig S, Franchi A, *et al*. Tumour lymphangiogenesis is a possible predictor of sentinel lymph node status in cutaneous melanoma: a case-control study [J]. J Clin Pathol, 2006, 59(2): 166 - 173.

[8] Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, *et al*. Importance of lymph vessels in gastric cancer: a prognostic indicator in general and a predictor for lymph node metastasis in early stage cancer[J]. J Clin Pathol, 2006, 59(1): 77 - 82.

[9] Wigle J T, Harvey N, Detmar M, *et al*. An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype[J]. EMBO J, 2002, 21(7): 1505 - 1513.

[10] Hong Y K, Harvey N, Noh Y H, *et al*. Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate[J]. Dev Dyn, 2002, 225(3): 351 - 357.

(编辑 吴培红)