DOI:10.16016/j.1000-5404.201604075

肝素酶介导的裸鼠肝癌门静脉微瘤栓形成

陈晓鹏[1],岳朝辅[1],卢林明[2],张文君[1] (241001 安徽 芜湖,皖南医学院弋矶山医院:肝胆外科[1],病理科[2])

[摘要] **目的** 探寻肝癌细胞中高表达的肝素酶(heparanase, HPSE)对裸鼠肝癌门静脉微瘤栓形成的影响。**方法** 根据既往研究结果,分别选取高表达和相对较低表达 HPSE 的 HCCLM3 和 HepG2 两种人肝癌细胞;调整细胞浓度,行裸鼠下腹腔注射 3×10^6 个癌细胞(均 300 μL);至第 3 周和第 5 周时,分别取标本观察网膜和肝脏成瘤率、血管侵犯和门静脉微瘤栓形成情况,以建立肝癌微瘤栓模型和普通肝癌模型。模型鉴定并复制,然后于腹腔注射癌细胞后第 2 周开始分别皮下注射 250 IU 的 HPSE 抑制剂肝素钠,1 次/3 d,共 2 周,并设生理盐水作为对照;仍于细胞注射第 3 周和第 5 周时,观察上述指标。**结果** 裸鼠腹腔接种后一般情况无改变;第 3 周时体质量明显增加($P<0.05$)。第 3 周和第 5 周时,两种肝癌细胞网膜成瘤率均为 5/5。第 3 周时,HCCLM3 细胞肝脏成瘤率(2/5)高于 HepG2 细胞(0/5)($P<0.05$);第 5 周时二者肝脏成瘤率相当(5/5 *vs* 4/5),但 HCCLM3 细胞肝转移灶体积较大。第 3 周和第 5 周时,HCCLM3 细胞网膜血管(或门静脉)侵犯比例(2/5,5/5)均高于 HepG2 细胞(0/5,3/5,$P<0.05$);第 3 周,两种癌细胞门静脉微瘤栓发生率相当(1/5 *vs* 0/5);第 5 周时,HCCLM3 细胞门静脉微瘤栓发生率(5/5)显著高于 HepG2 细胞(0/5,$P<0.05$)。应用肝素钠皮下注射至接种第 3 周时,HCCLM3 细胞网膜及肝脏转移、血管侵犯及微瘤栓形成显著少于生理盐水组($P<0.05$),HepG2 细胞网膜成瘤亦减少($P<0.05$)。第 5 周时,两种细胞均再现肝转移灶,且 HCCLM3 细胞复现门静脉微瘤栓,但肝素组 HCCLM3 细胞所致的网膜和肝脏成瘤、血管侵犯和门静脉微瘤栓形成率仍明显少于生理盐水组($P<0.05$)。**结论** 腹腔注射高表达 HPSE 的 HCCLM3 细胞可成功介导肝癌门静脉微瘤栓形成;HPSE 可能是微瘤栓形成重要因素。

[关键词] 肝素酶;肝细胞癌;门静脉;瘤栓;血管侵犯
[中图法分类号] R-332; R345.72; R735.7 [文献标志码] A

Heparanase-mediated formation of portal venous microemboli in nude mice of hepatocellular carcinoma

Chen Xiaopeng[1], Yue Chaofu[1], Lu Linming[2], Zhang Wenjun[1] ([1]Department of Hepatobiliary Surgery, [2]Department of Pathology, Affiliated Yijishan Hospital of Wannan Medical College, Wuhu, Anhui Province, 241001, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of high expression of heparanase (HPSE) in hepatocellular carcinoma (HCC) cells on the formation of portal venous microemboli (PVME) in HCC nude mice. **Methods** HCCLM3 cells with high expression of HPSE and HepG2 cells with relatively low expression of HPSE were selected basing on our previous study. Nude mice were intraperitoneally injected with 300 μL of HCC cells (3×10^6 cells), and the tumor formation in the omentum and liver were respectively observed in 3 and 5 weeks after injection. The vessel invasion and PVME were observed by microscopy. After the HCC models were established, the nude mice were subcutaneously injected with heparin sodium at a dose of 250 IU once per 3 d for 2 weeks in 2 weeks after HCC cells injection, and normal sodium was used for control. **Results** All nude mice survived without obvious changes in diet and activity, and their weight significantly increased in the 3rd week ($P<0.05$). For the 2 kinds of HCC cells, the tumor formation rate was both 5/5

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81272412)
[通信作者] 陈晓鹏, E-mail:drcxp@qq.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160831.1419.016.html(2016-08-31)

in the omentum at the 3rd and 5th weeks. The tumor formation rate of HCCLM3 cells in the liver was significantly higher than that of HepG2 cells at the 3rd week (2/5 *vs* 0/5, $P<0.05$), and the rates of the 2 kinds of cells were similar at the 5th week (5/5 *vs* 4/5), but the tumor sizes were larger in those induced by HCCLM3 cells. At the the 3rd and 5th weeks, HCCLM3 cells mediated more vessel invasions in the omentum and portal vein than HepG2 cells (2/5 *vs* 0/5, 5/5 *vs* 3/5, both $P<0.05$). PVME rate was similar in the HCCLM3 cells and HepG2 cells at the 3rd week (1/5 *vs* 0/5), but significantly higher in the former than the latter cells at the 5th week (5/5 *vs* 0/5, $P<0.05$). Subcutaneous injection of heparin for 2 weeks attenuated the omentum and liver metastases, vessel invasion and PVME in the HCCLM3 cells group compared with normal sodium group at the 3rd week (all $P<0.05$). HepG2 cells induced omentum metastasis was also decreased obviously ($P<0.05$). After heparin was withdrawn, liver metastases were found again in the 2 kinds of models at the 5th week, and HCCLM3 cells mediated PVME appeared once again. HCCLM3 cells induced the omentum and liver metastases, vessel invasion and PVME in heparin group were all less than normal sodium group (all $P<0.05$). **Conclusion** Intraperitoneal injection of HPSE highly-expressed HCCLM3 cells can successfully mediate the formation of PVME in nude mice HCC model. HPSE may be one of important factors of PVME formation.

[**Key words**] heparanase; hepatocellular carcinoma; portal vein; tumor embolus; vessel invasion

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81272412). Corresponding author: Chen Xiaopeng, E-mail: drcxp@qq.com

原发性肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一,其中肝细胞癌(以下简称肝癌,hepatocellular carcinoma,HCC)占90%,死亡率仅次于胃癌和食道癌。HCC以肝内血行转移即门静脉播散为主要转移途径,肝癌多中心发生本质上也是肝内血行转移[1-3]。一般认为,超过99%的肝癌细胞进入血液循环后会被人体的免疫机制和正常血流剪切力杀灭,仅极少数因激活血小板产生粘附分子,形成微瘤栓而逃过宿主防护,进而通过内皮下基质降解而被微血管捕获并穿出血管壁,形成新的转移灶[4]。有研究报道,肝细胞癌患者常伴有门静脉癌栓(portal vein tumor thrombus, PVTT)形成[5-6],肝癌瘤块直径越大伴发门静脉癌栓的概率越高[7]。因此,肝癌细胞侵入血管后形成微瘤栓是肿瘤转移的一个关键环节。HCC患者一旦发生肝内转移,预后极差。因此,深入探明其机制,确立细胞粘附、瘤栓形成的新靶点,具有重要意义。

肝素酶(heparanase,HPSE)是一种特殊的基质降解酶,在大部分恶性肿瘤包括肝癌细胞中呈不同程度表达[8-10]。研究表明,HPSE通过降解硫酸乙酰肝素蛋白多糖(heparan sulfate proteoglycans,HSPGs),与其他蛋白水解酶协同破坏、降解细胞外基质和基底膜屏障,促进癌细胞侵袭和转移[8,11-12],并参与凝血和血栓形成等过程[13]。鉴于HPSE在肝癌细胞高表达、呈现高活性,而循环中的肿瘤细胞具有激活血小板粘附形成瘤栓的能力[4,14],我们推测HPSE可能参与肝癌微瘤栓形成并进一步侵出血管内膜向远处转移。但目前还缺乏直接证据[15-16]。本研究应用高表达HPSE的肝癌细胞腹腔注射建立裸鼠肝癌门静脉微瘤栓模型,结合应用HPSE抑制剂肝素,探讨HPSE在肝癌微瘤栓形成中的关键作用。

1 材料与方法

1.1 材料

根据研究[17]结果,分别选取HPSE高表达的HCCLM3(购自上海中山医院肝癌研究所)和相对较低表达的HepG2(购自上海中科院上海细胞库)两种人肝癌细胞。10%胎牛血清、RPIM1640培养基为Gibco公司产品。光学显微镜为Olympus公司产品。雄性4周龄裸鼠(BALB/C-nu/nu)70只,体质量16~20 g,扬州大学比较医学中心提供。无菌垫料、颗粒饲料由南京市江宁区青龙山动物繁殖场提供。肝素钠注射液常州千红生化制药股份有限公司(国药准字H32022088,批号060310)。

1.2 细胞培养

将复苏的HCCLM3、HepG2细胞,移入25 mL培养瓶内培养;待HCCLM3细胞传至第16瓶,HepG2细胞传至第14瓶时,再分别传入75 mL大瓶内;细胞长满至80%以上时,PBS清洗3遍;加1.5 mL胰酶消化,3 mL含10%胎牛血清的DMEM(高糖)培养基中止消化,再转移到10 mL EP管内;常温1 000 r/min离心5 min,弃废液,根据离心管内沉淀的细胞量,加入5~7 mL的PBS重悬细胞。生理盐水调整为1×10^6/300 μL、3×10^6/300 μL、5×10^6/300 μL三种细胞浓度,置于冰上备用。

1.3 裸鼠肝癌门静脉微瘤栓模型的建立与鉴定

动物实验经皖南医学院弋矶山医院伦理委员会批

准。分别用上述三种细胞浓度的两种 HCC 细胞行裸鼠下腹腔注射,进行预实验;根据预实验结果,两种癌细胞均选取 3×10^6/300 μL 的浓度进行正式实验。4 周大小的雄性裸鼠随机分为 3 组,每组 10 只,SPF 级饲养。75% 酒精消毒下腹部皮肤,3 组分别于下腹腔注射生理盐水和两种癌细胞各 300 μL。常规饲养、观察。至接种后第 3、5 周,各组分别取 5 只解剖、观察,取网膜和肝脏,福尔马林固定,常规石蜡包埋,4 μm 薄层切片、HE 染色,显微镜观察、鉴定。

1.4　皮下注射肝素钠

预实验以 125、250、500 IU 的肝素给裸鼠皮下注射,综合考虑动物一般情况、出血和死亡率,本研究选取 250 IU 的肝素皮下注射用于正式实验。鉴定证实上述两种模型,并进行复制,各分为 2 组。其中一组于细胞接种后第 2 周皮下注射肝素钠 250 IU,1 次/3 d,共 2 周,记为肝素组;另一组皮下注射等量生理盐水作为对照。常规饲养、观察。分别于细胞接种第 3、5 周时,各组取 5 只裸鼠作 1.3 同样观察。

1.5　观察指标

包括裸鼠一般情况、饮食、活动、体质量和出血情况;解剖观察腹腔网膜和肝脏成瘤率,显微镜下随机选取 5 个视野,观察网膜和门静脉血管侵犯及微瘤栓形成情况。

1.6　统计学分析

计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 SigmaStat 3.5 软件进行方差分析、q 检验;计数资料比较用四格表确切概率法。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　肝素酶介导肝癌门静脉微瘤栓模型的鉴定

观察期内裸鼠腹腔接种后均存活,饮食、活动无明显改变。随着时间延长,体质量呈增加趋势(表 1);3 周后体质量较实验前增加明显($P<0.05$);但同时期各组间差异无统计学意义($P>0.05$)。

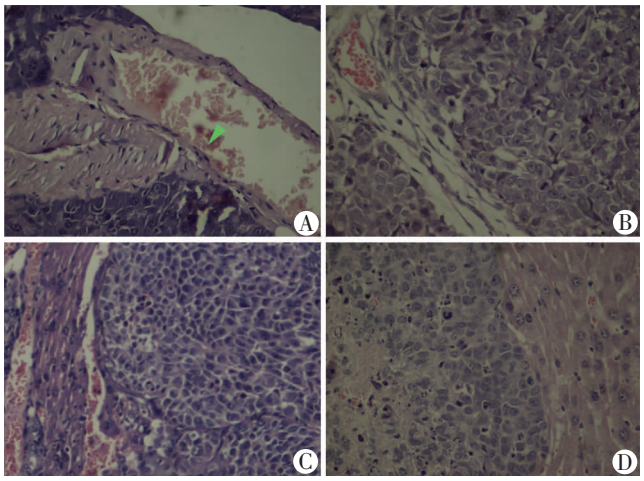
表 1　各组裸鼠体质量变化($\bar{x}\pm s$,g)

组别	实验前($n=10$)	第 3 周($n=10$)	第 5 周($n=5$)
生理盐水组	17.2±2.1[a]	23.2±2.2	24.3±2.5
HCCLM3 细胞组	17.1±1.8[a]	21.8±1.9	23.4±2.2
HepG2 细胞组	17.4±1.8[a]	22.4±2.1	22.5±2.1

a:$P<0.05$,与第 3、5 周时比较

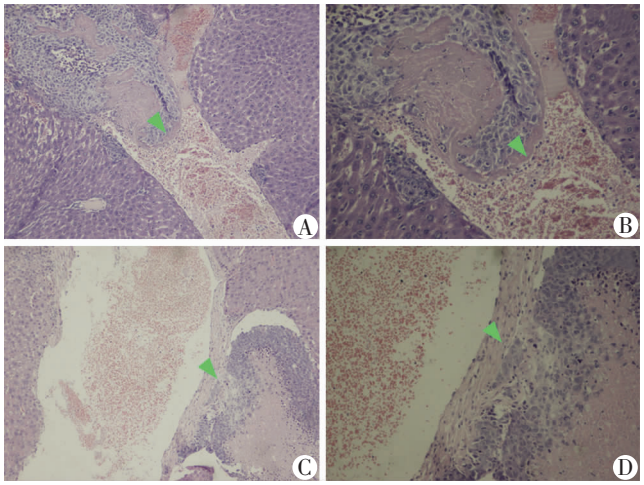
腹腔注射 HCC 细胞,3 周后两种癌细胞网膜均见癌结节形成(5/5),HCCLM3 细胞癌结节较为稀疏,直径 1~2 mm;HepG2 细胞癌结节分布密集,直径 1~4 mm。镜下见癌细胞呈实性巢状结构,细胞质丰富,界限不清,核大小形态不一,染色质颗粒粗,核仁明显,病理性核分裂象多见,其中 HCCLM3 细胞裸鼠(2/5)见肿瘤入侵网膜血管(图 1A、B)。HCCLM3 细胞部分裸鼠见肝脏转移灶(2/5)、门静脉侵犯(2/5)和微瘤栓形成(1/5);HepG2 细胞则未见。

至第 5 周时,两种癌细胞网膜癌结节较第 3 周时增多、增大,大小分别为 1~3 mm 和 2~5 mm。镜下网膜血管受侵(分别为 5/5、3/5)亦增多。肝脏转移(5/5、4/5)亦增加(图 1C、D),HCCLM3 细胞肝转移灶较大,最大直径约 1.0 cm;门静脉受侵更为常见(5/5、3/5,图 2);HCCLM3 细胞裸鼠均见门静脉及汇管区微癌栓(5/5,图 3),HepG2 细胞则未发现(0/5)。



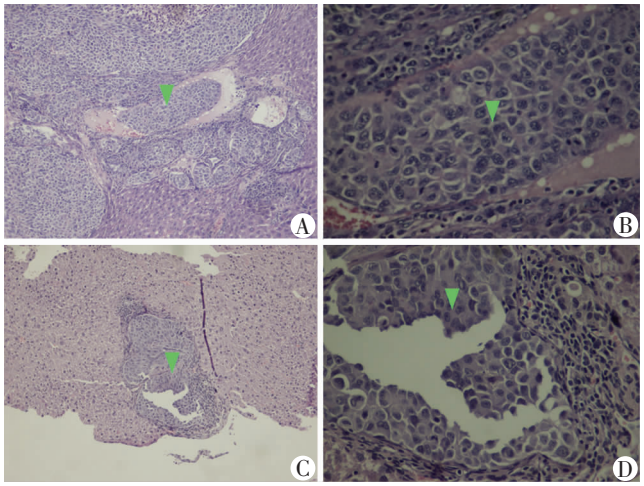
A:HCCLM3 细胞腹腔网膜癌结节,绿色三角示癌细胞侵犯网膜血管;B:HepG2 细胞腹腔网膜癌结节;C:HCCLM3 细胞肝内转移灶;D:HepG2 细胞肝内转移灶

图 1　肝癌细胞裸鼠腹腔注射成瘤病理观察　(HE ×400)



绿色三角示血管侵犯;A:HCCLM3 细胞侵犯门静脉(×100);B:HCCLM3 细胞侵犯门静脉(×200);C:HepG2 细胞侵犯门静脉(×100);D:HepG2 细胞侵犯门静脉(×200)

图 2　肝癌细胞侵犯门静脉血管　(HE)



绿色三角示癌栓;A:门静脉微癌栓(×100);B:门静脉微癌栓(×400);C:汇管区微癌栓(×100);D:汇管区微癌栓(×400)

图3 HCCLM3细胞肝癌门静脉和汇管区微瘤栓 (HE)

2.2 肝素对门静脉微瘤栓的作用

荷瘤裸鼠肝素钠皮下注射部位可见小片状出血。随着注射次数增加裸鼠活动减少,出现嗜睡、精神萎靡、皮肤缺少光泽。体质量随时间延长呈增加趋势(表2)。接种5周体质量较实验前增加明显($P<0.05$),但同时期各组间差异无统计学意义($P>0.05$)。本剂量未见引起大出血和死亡。

表2 应用肝素钠各组动物体质量变化($\bar{x}\pm s$,g)

组别	实验前($n=10$)	第3周($n=10$)	第5周($n=5$)
HCCLM3+生理盐水	17.0±1.9	21.5±2.0	22.6±2.4[a]
HCCLM3+肝素钠	17.3±1.9	19.9±2.1	21.9±2.4[a]
HepG2+生理盐水	17.4±1.8	21.4±2.2	22.7±2.3[a]
HepG2+肝素钠	17.6±1.9	20.1±2.0	21.4±2.2[a]

a:$P<0.05$,与实验前比较

肝素钠皮下注射荷瘤裸鼠至制模第3周时,HCCLM3和HepG2细胞出现网膜癌结节的裸鼠数(1/5、2/5)均显著少于生理盐水组(5/5、5/5,$P<0.05$),体积亦减小;镜下,HCCLM3细胞肝素组网膜血管侵犯消失(0/5)。相比生理盐水组,HCCLM3细胞肝素组亦未见肝脏转移、门静脉受侵和微瘤栓形成(0/5,$P<0.05$)。第5周时,随着肝素的停用,腹腔网膜瘤块较第3周有所生长,但两种细胞肝素组网膜成瘤裸鼠数(3/5、2/5)均少于生理盐水组(5/5、5/5,$P<0.05$),体积亦较小;HCCLM3细胞肝素组再现网膜血管受侵(3/5)。HCCLM3细胞肝素复现肝转移、门静脉受侵和微瘤栓形成(均为2/5),但均明显少于生理盐水组(均5/5,$P<0.05$);HepG2细胞肝素组可见到肝脏转移、门静脉受侵(均为2/5),少于生理盐水组(分别为4/5和3/5),但差异无统计学意义($P>0.05$),肝素组和生理盐水组均未见微瘤栓形成。

3 讨论

现阶段,HCC转移复发仍是患者死亡的主要原因。HCC以肝内血行转移即门静脉播散为主要转移途径,其多中心发生本质上也是肝内血行转移[1-3]。其中,HCC细胞侵入血管后形成微瘤栓是肿瘤转移的一个关键环节。因此,建立接近于人体的HCC微瘤栓动物模型、深入探寻其机制和有效防治措施,具有重要的科学意义。

3.1 肝素酶介导的肝癌门静脉微瘤栓形成

文献报道的动物肝癌移植瘤模型,有较高的成瘤率或肝转移率,但均无肝内癌栓或微癌栓的观察描述[18-21],故对本研究可能并无价值;我们亦多次尝试利用多种肝癌细胞皮下接种、肝脏原位移植以建立肝癌转移模型,但均未观察到门静脉或汇管区微癌栓,故而放弃。另有报道,裸鼠脾血管注射肝胆管细胞癌[22]、肝脏或脾内注入人结肠癌细胞[23-24],建立肝转移癌模型,均有高成瘤率和肝转移率的特点。从血液流向看,脾血管或脾脏注射法易于产生门静脉转移,并于门静脉内形成微瘤栓。我们亦曾参照上述方法,分别采用不同的HCC细胞行裸鼠脾血管或脾脏注射,但均未观察到肝癌形成。我们推测,裸鼠体积小,其脾静脉或门静脉容量更小,难以注入足够剂量的癌细胞,故不足以形成肝转移癌;如强行加大剂量,则易引起门静脉高压,滞留于脾静脉或门静脉内高浓度的癌细胞大部死亡,难以成癌;且裸鼠脾静脉纤细,穿刺注射失败率较高,可操作性不强。

本研究经过不断摸索,最后选用HPSE不同表达水平的HCCLM3和HepG2两种HCC细胞行裸鼠下腹腔注射,结果发现,观察期内HCC细胞对裸鼠一般情况及体质量无明显影响。两种HCC细胞均能形成肝转移癌。腹腔注射3×10^6个(300 μL)高表达HPSE的HCCLM3细胞易于发生肝脏转移、血管侵犯、门静脉和汇管区微瘤栓(汇管区少于门静脉);至第5周,裸鼠均见上述现象,且肝转移灶体积较大;但网膜癌结节形成晚于HepG2细胞,结节数量和大小也次于HepG2细胞。稍低表达HPSE的HepG2细胞网膜结节形成比较显著,但肝脏转移、血管受侵则次于HCCLM3细胞,且无微癌栓发现。

通常情况下,HCC原发灶癌细胞先局部浸润、增殖、降解门静脉细胞外基质,突破基底膜进入门脉循

环。然后在多种蛋白酶、组织因子和粘附分子作用下,通过激活血小板,介导血小板和癌细胞粘附形成微癌栓;微癌栓一部分不断聚集形成癌栓,另一部分随门脉循环,被微血管捕获粘附于微血管内皮细胞,再穿破微血管进入肝内,进一步分裂增殖,形成新的癌灶[25]。本研究腹腔注射的癌细胞先于网膜定殖、侵入网膜血管,再汇入门静脉。是否在此时即粘附形成微癌栓、再经微血管捕获入肝,而与上述规律有异?但本研究两种癌细胞均见肝癌灶形成,而 HepG2 细胞始终未见微癌栓。据此,我们推测二者有不同的成瘤机制:由网膜吸收而来癌细胞粘附直接形成癌栓的可能性不大;HCCLM3 细胞肝癌灶较多可能与其微癌栓形成有关。网膜吸收进入门静脉的癌细胞(如 HepG2 细胞),可直接穿透门静脉壁进入肝脏,这与结肠癌细胞肝转移类似[23-24];待增殖至一定阶段,HCCLM3 再遵循上述规律反向侵入门静脉、形成微癌栓、再被微血管捕获、最后入肝形成新的癌灶。实验结果提示,我们首次利用腹腔注射高表达 HPSE 的 HCCLM3 细胞成功制作了肝癌裸鼠门静脉微瘤栓模型,为后续实验奠定了基础。

3.2 肝素对肝癌微瘤栓的抑制作用

研究[26-27]证明,HPSE 作为内切糖苷酶,可降解 HSPGs 的硫酸肝素侧链,重塑细胞外基质和基底膜,是癌细胞转移及血管形成的先决条件;下调 HPSE 表达可降低癌细胞的侵袭、转移能力,HPSE 之 RNAi 瞬时转染可以抑制多种癌的侵袭、转移及血管生成。我们先前实验证实 HCC 细胞普遍高表达 HPSE,其中 HCCLM3 细胞表达高于 HepG2,RNAi 可以抑制肝癌细胞动态粘附、侵袭和迁移能力[28]。另一方面,HPSE 可中和肝素的抗凝特性,在癌症进程中表现为促凝活性[13,29-30],可作为潜在的抗粘附靶标[31]。故推测其可能具有促进癌细胞与血小板粘附聚集、癌栓形成等作用。

为证明以上推测,需对癌细胞中高表达的 HPSE 进行调节研究。但由于动物实验时间较长,无法通过 RNAi 瞬时转染进行观察。肝素是一种糖类 HPSE 抑制剂,具有抗凝活性,近年还发现其具有抗癌细胞增殖、浸润、转移活性。在不易取得稳转 RNAi 的情况下,我们直接选用肝素钠对模型动物进行干预观察。结果发现,注射肝素钠后于接种第 3 周时,两种模型腹腔网膜发现癌结节的裸鼠数均较生理盐水组减少,且均无肝转移、门静脉侵犯及微瘤栓发现;而随着肝素的停用,至第 5 周时,两种细胞均再次出现肝转移和血管侵犯,HCCLM3 细胞复现门静脉微瘤栓,但均仍少于生理盐水组。结合既往实验[32],可进一步推测 HPSE 的促侵袭转移特性,部分可能是通过促进癌细胞(如 HCCLM3)微瘤栓形成来实现的,肝素抑制癌转移及癌栓形成作用可能与其抑制 HPSE 的促凝活性密切相关。

综上所述,本研究利用高表达 HPSE 的 HCC 细胞腹腔注射成功建立了裸鼠肝癌门静脉微瘤栓模型,HPSE 可能是微瘤栓形成的重要因素,肝素可明显抑制其侵袭转移及微瘤栓形成。但其具体机制及肝素剂量过大引起的出血死亡,均需进一步探讨。

志谢 感谢皖南医学院弋矶山医院中心实验室吕坤、钟民、唐宗生、张梦莹、李雪琴和所起凤老师,病理科李佳佳和徐友海老师对本实验的技术指导和帮助

参考文献:

[1] 王健, 孙燕, 崔云龙, 等. 肝癌多中心发生与肝内转移的临床病理学差异研究[J]. 中华肝胆外科杂志, 2009, 15(4): 247-250. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-8118.2009.04.003

[2] 樊嘉, 史颖弘. 肝癌复发和转移的新理念[J]. 中华消化外科杂志, 2010, 9(1): 10-11. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2010.01.005

[3] Takizawa D, Kakizaki S, Sohara N, *et al*. Hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombosis: clinical characteristics, prognosis, and patient survival analysis[J]. Dig Dis Sci, 2007, 52(11): 3290-3295. DOI: 10.1007/s10620-007-9808-2

[4] 宫亮, 杨和平. 循环中血小板活化对肿瘤血行转移的影响[J]. 山东医药, 2011, 51(4): 103-105. DOI: 10.3969/j.issn.1002-266X.2011.04.052

[5] Forner A, Llovet J M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 2012, 379(9822): 1245-1255. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)61347-0

[6] 广东省抗癌协会肝癌专业委员会, 广东省医学会肝胆胰外科学分会. 肝细胞肝癌合并门静脉癌栓多学科团队综合治疗广东专家共识(2015 版)[J]. 中华消化外科杂志, 2015, 14(9): 694-701. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673--9752.2015.09.002

[7] Kaibori M, Ishizaki M, Matsui K, *et al*. Predictors of microvascular invasion before hepatectomy for hepatocellular carcinoma[J]. J Surg Oncol, 2010, 102(5): 462-468. DOI: 10.1002/jso.21631

[8] Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, *et al*. Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis[J]. Nat Med, 1999, 5(7): 793-802. DOI: 10.1038/10518

[9] Chen G, Dang Y W, Luo D Z, *et al*. Expression of heparanase in hepatocellular carcinoma has prognostic significance: a tissue microarray study[J]. Oncol Res, 2008, 17(4): 183-189. DOI: http://dx.doi.org/10.3727/096504008785114138

[10] Chen X P, Liu Y B, Rui J, *et al*. Heparanase mRNA expression and point mutation in hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(19): 2795 – 2799. DOI: 10.3748/wjg.v10.i19.2795

[11] Zheng L, Jiang G, Mei H, *et al*. Small RNA interference-mediated gene silencing of heparanase abolishes the invasion, metastasis and angiogenesis of gastric cancer cells[J]. BMC Cancer, 2010, 10: 33. DOI: 10.1186/1471-2407-10-33

[12] Liu X Y, Tang Q S, Chen H C, *et al*. Lentiviral miR30-based RNA interference against heparanase suppresses melanoma metastasis with lower liver and lung toxicity[J]. Int J Biol Sci, 2013, 9(6): 564 – 577. DOI: 10.7150/ijbs.5425

[13] Nadir Y, Brenner B. Heparanase procoagμlant effects and inhibition by heparins[J]. Thromb Res, 2010, 125(S2): S72 – S76. DOI: 10.1016/S0049-3848(10)70018-9

[14] Tsuruo T, Fujita N. Platelet aggregation in the formation of tumor metastasis[J]. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2008, 84(6): 189 – 198. DOI: 10.2183/pjab/84.189

[15] Ilan N, Elkin M, Vlodavsky I. Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis.[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38(12): 2018 – 2039. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.06.004

[16] Wang G B, Zhou X Y, Wang X Q. Relationship between serum heparanase and microscopic venous invasion in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Am J Clin Pathol, 2010, 134(2): 242 – 248. DOI: 10.1309/AJCPPJM6VHG4LPJX

[17] Chen B, Chen X P, Wu M S, *et al*. Expressions of heparanase and upstream stimulatory factor in hepatocellular carcinoma[J]. Eur J Med Res, 2014, 19: 45 – 52. DOI: 10.1186/s40001-014-0045-9

[18] 陶莹, 于玮, 王珏, 等. 裸鼠人肝癌原位移植瘤模型的建立[J]. 北京医学, 2012, 34(12): 1065 – 1067. DOI: 10.15932/j.0253-9713.2012.12.028

[19] Sun F X, Tang Z Y, Lui K D, *et al*. Establishment of a metastatic model of human hepatocellular carcinoma in nude mice *via* orthotopic implantation of histologically intact tissues[J]. Int J Cancer, 1996, 66(2): 239 – 243.

[20] 郑建明, 陶文照, 郑唯强, 等. 人肝癌裸鼠皮下-肝原位移植瘤模型的建立[J]. 第二军医大学学报, 2000, 21(5): 456 – 459. DOI: 10.3321/j.issn: 0258-879X.2000.05.018

[21] Yamada N, Chung Y S, Arimoto Y, *et al*. Establishment of a new human extrahepatic bile duct carcinoma cell line (OCUCh-LM1) and experimental liver metastatic model [J]. Br J Cancer, 1995, 71(3): 543 – 548. DOI: 10.1038/bjc.1995.107

[22] Li J, Yao Q, Liu D. Hydrodynamic cell delivery for simultaneous establishment of tumor growth in mouse lung, liver and kidney[J]. Cancer Biol Ther, 2011, 12(8): 737 – 741. DOI: 10.4161/cbt.12.8.16442

[23] 黄平, 楼荣灿, 张学栋, 等. 脾切除法建立人结肠癌细胞肝转移模型及对肝转移的评估[J]. 癌症, 2000, 19(9): 879 – 882. DOI: 10.3321/j.issn: 1000-467X.2000.09.010

[24] 袁岱岳, 郭忠英, 赵任, 等. 人结肠癌裸鼠肝转移模型的建立[J]. 肿瘤防治研究, 2011, 38(1): 28 – 30. DOI: 10.3971/j.issn.1000-8578.2011.01.008

[25] Fidler I J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(6): 453 – 458. DOI: 10.1038/nrc1098

[26] Yu S J, Kang X H, Zhang J N, *et al*. Effects of small interfering RNA targeting heparanase-1 combined with heparin on invasiveness of mouse hepatocellular carcinoma cell lines [J]. Chin J Cancer, 2010, 29(9): 816 – 823. DOI: 10.5732/cjc.009.10746

[27] Xiong Z, Lv M H, Fan Y H, *et al*. Downregulation of heparanase by RNA interference inhibits invasion and tumorigenesis of hepatocellular cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Int J Oncol, 2012, 40(5): 1601 – 1609. DOI: 10.3892/ijo.2012.1338

[28] Chen X P, Luo J S, Tian Y, *et al*. Downregulation of heparanase expression results in suppression of invasion, migration and adhesion abilities of hepatocellular carcinoma cells[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 241983. DOI: 10.1155/2015/241983

[29] Nadir Y, Brenner B, Fux L, *et al*. Heparanase enhances the generation of activated factor X in the presence of tissue factor and activated factor Ⅶ[J]. Haematologica, 2010, 95(11): 1927 – 1934. DOI: 10.3324/haematol.2010.023713

[30] Nadir Y, Brenner B. Heparanase multiple effects in cancer [J]. Thromb Res, 2014, 133(S2): S90 – S94. DOI: 10.1016/S0049-3848(14)50015-1

[31] Goldshmidt O, Zcharia E, Cohen M, *et al*. Heparanase mediates cell adhesion independent of its enzymatic activity [J]. FASEB J, 2003, 17(9): 1015 – 1025. DOI: 10.1096/fj.02-0773com

[32] 陈晓鹏, 刘颖斌, 史良会, 等. 肝素对肝癌细胞乙酰肝素酶 mRNA 表达和侵袭能力的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(7): 810 – 813. DOI: 10.3969/j.issn.1009-2501.2006.07.020

(**收稿**:2016-04-16;**修回**:2016-07-10)

(编辑 邓强庭)