维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)03-0318-04

人乳腺癌裸鼠移植瘤内淋巴管的形态学特点

杜果城,吴诚义

(重庆医科大学附属第一医院普外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察人乳腺癌裸鼠移植瘤内淋巴管的形态及特点,进而探讨移植瘤内是否存在淋巴管新生。方法:将人乳腺浸润性导管癌组织小块移植于 5 只 BALB/c 裸鼠胸部乳垫皮下,建立移植瘤模型,52 天时摘取肿瘤。采用 HE 染色观察移植瘤组织学特征,用 VEGFR-3 标记淋巴管内皮法光镜下观察毛细淋巴管;应用透射电镜观察移植瘤内毛细淋巴管及内皮细胞超微结构。结果:裸鼠接种部位可见直径约 0.6 ~ 0.8cm 大小的肿块。淋巴管内皮标记法可见肿瘤内有较多染成棕黄色的毛细淋巴管,壁厚、腔细、呈条索样的管状结构,肿瘤周边区似多于中心区。透射电镜下,肿瘤内可见较多形态不规则、壁厚腔细、基底膜常不连续、腔面较多微绒毛、管壁外锚丝甚少的毛细淋巴管,其内皮细胞高尔基复合体及粗面内质网丰富、质膜小泡含量甚少。结论:人乳腺癌裸鼠移植瘤内显示有淋巴管新生。

【关键词】乳腺癌;移植瘤;淋巴管新生;电镜;裸鼠

【中国图书分类法分类号】R737.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-10-11

Morphological characteristics of lymphatics in transplantation tumor model of human breast infiltrating duct carcinoma in nude mice

DU Guocheng , et al

(*Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the morphological characteristics of lymphatics and to investigate the intratumoral lymphangiogenesis in transplantation tumor model of human breast infiltrating duct carcinoma in nude mice. *Methods*: Small slices of human breast carcinoma tissue were transplanted into 5 nude mice to establish implanted tumor model. HE staining was used to observe the characteristics of the transplantation tumors. Vascular endothelial growth factor-3 (VEGFR-3) label staining was performed to observe lymphatics, and ultrastructure of lymphatics was observed with transmission electron microscope (TEM). *Results*: Tumors were viable in a11 the mice, and grew up to about 0.6~0.8 centimeters in diameter after 52 days when specimen was collected. Under light microscope, lymphatics were found in all the tumors, and were located seemingly much more in periphery than in the center of the tumors. Under TEM some characteristics of neogentic lymphatics could be seen, such as thick wall, narrow lumen, changes of organell, etc. *Conclusion*: Neogentic lymphatics can be seen in transplantation tumor model of human breast infiltrating duct carcinoma in nude mice.

【Key words】Breast carcinoma; Transplantation tumor; Lymphangiogenesis; Electron microscope; Nude mice

许多关于人体癌组织的研究,证明了肿瘤内存在大量的毛细淋巴管[1],但这些淋巴管是新生的还是该组织原有的尚有一定分歧[2,3]。本研究采用人乳腺浸润性导管癌组织小块建立裸鼠移植瘤模型,观察移植瘤内淋巴管的存在与否、分布情况及超微结构特点,进而探讨肿瘤内是否存在淋巴管新生。

1 材料与方法

1.1 实验动物

BALB/C-nu/nu 小鼠 5 只,雌性,4~6 周龄,未交配,体重 16.5~18.6g/ 只,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司(动物合格证号:SCXK(沪)2003-0003);人乳腺浸润性导管癌裸鼠移植瘤第 38 代荷瘤裸鼠 1 只,购自四川大学华西医学中心,均饲养于 SPF 环境中。

1.2 主要试剂及设备

1.2.1 免疫组化试剂 兔抗人 VEGFR-3 多克隆抗体浓缩液 0.1ml、即用型 SABC 免疫组化试剂盒及 DAB 显色试剂盒均

作者介绍:杜果城(1975-),男,硕士,
主要研究方向:内分泌外科基础与临床。

基金项目:重庆市卫生局科研项目(03-02-074)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

鸥自武汉博士德生物工程有限公司。粘片剂多聚赖氨酸 10ml 购自 Sigma 公司。

1.2.2 H6000 型电镜及检查 所需试剂由重庆医科大学电子显微镜室提供。

1.2 方法

1.2.1 移植瘤模型建立和标本处理

待荷瘤种鼠之肿瘤长至直径约 1.5cm 大小时，于超净工作台中严格无菌条件下完整剥取后，剪成 1mm³ 大小的小块，用导管针每次吸取 1~2 粒，接种于右前肢根部内侧之乳腺脂肪垫组织处，夹闭针孔。并继续饲养在 SPF 环境中。

接种后第 52 天当各只裸鼠肿瘤长至直径约 0.6~0.8cm 时，摘取整个移植瘤组织。每一个瘤组织分为 2 份，1 份经 10% 中性福尔马林固定，常规石蜡包埋切片，用于 HE 染色和淋巴管内皮标记(免疫组化)；另 1 份经 3% 戊二醛固定 2h 后，依次用 1% 锇酸(pH 7.2 ~ 7.4)固定、酒精和丙酮逐级脱水，环氧树脂 618 包埋，用于电镜观察。

1.2.2 一般形态学观察

常规切片、染色，观察肿瘤组织特征、瘤细胞的分化程度。

1.2.3 SABC 法检测 VEGFR-3 的表达

1.2.3.1 操作步骤 按试剂盒说明书进行。

1.2.3.2 观察和结果判定 VEGFR-3 阳性表达在内皮细胞呈棕黄色或棕褐色，并呈管腔样结构，同时，观察其分布特点。参照文献[9]计数微淋巴管密度：先于低倍镜下观察表达热区，再于 400 倍视野下计数热区内 3 个视野内淋巴管数，取平均值($n_1+n_2+n_3$)/3 计数该标本微淋巴管密度(MLD)。

1.2.4 电镜观察

常规制片于透射电镜下观察毛细淋巴管的形态特点及其内皮细胞超微结构，用以鉴定其是否符合新生淋巴管的形态学特征。

2 结 果

2.1 移植瘤形成

接种后 10~17 天各只裸鼠在接种部位均长出肿块，移植成功率 100%，后呈进行性生长，至 52 天移植瘤直径约为 0.6~0.8cm，边界尚清，活动，肿瘤表面可见扩张的毛细血管。

2.2 光镜观察

2.2.1 一般形态 肿瘤细胞呈柱状、卵圆形，体积大，胞浆红染；核大、深染，常见有切迹、凹陷，核形不规则，核染色质疏松；核浆比例较大。瘤细胞或散在分布，或呈条索状排列及呈腺样或团块样分布，实质多，间质少。肿瘤的中心区可见片状瘤细胞坏死、液化区(见图 1)。肿瘤的周边可见淋巴细胞浸润。



图 1 人乳腺浸润性导管癌裸鼠移植瘤模型(HE×400)

2.3 免疫组化

肿瘤内可见较多 VEGFR-3 抗体阳性标记的管腔样结构，管腔较细小，分布于肿瘤实质中，密度不等(见图 2 及表 1)，根据密度大小可分为 VEGFR-3 表达“热区”和“冷区”，周边区多为“热区”。

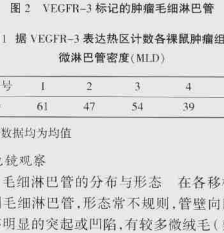


图 2 VEGFR-3 标记的肿瘤毛细淋巴管

表 1 据 VEGFR-3 表达热区计数各裸鼠肿瘤组织微淋巴管密度(MLD)

裸鼠编号	1	2	3	4	5
MLD	61	47	54	39	43

注：各数据均为均值

2.4 电镜观察

2.4.1 毛细淋巴管的分布与形态 在各移植瘤内均见到毛细淋巴管，形态常不规则，管壁向腔内形成许多明显的突起或凹陷，有较多微绒毛(瓣膜样结构)或小梁状结构突向管腔，基底膜常不连续，管壁外锚丝甚少(图 3)；管壁由一层完整的内皮细胞组成，内皮细胞间连接以紧密连接最多(图 4)，偶可见开放连接。多数管壁较厚，腔狭细，甚至有的淋巴管管腔尚未良好开放(图 5)，在毛细淋巴管的周围可见大量癌细胞。

维普资讯 http://www.cqvip.com

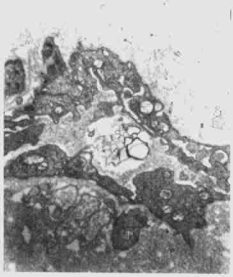


图 3 毛细淋巴管形态管不规则，管壁较多突起或凹陷及小梁状结构突向管腔基底膜常不连续，EM ×8000

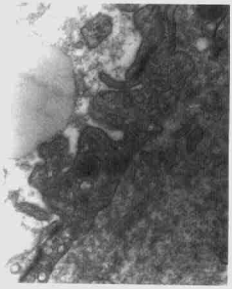


图 4 新生淋巴管内皮细胞间紧密连接 EM×30000

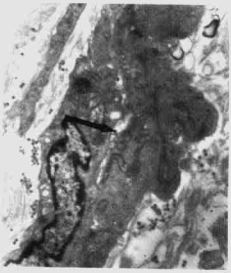


图 5 管腔尚未良好开放的新生淋巴管 EM×1000

2.4.2 毛细淋巴管内皮细胞的亚细胞结构 毛细淋巴管内皮细胞有大量的高尔基体、线粒体、丰富的粗面内质网和核糖体及少量的溶酶体，但吞饮小泡少见。这些细胞器多分布于胞质较厚处，其中高尔基体有轻微的形态改变，部分粗面内质网扩张、有的线粒体嵴断裂、排列紊乱甚至消失呈空泡状（图 6、7）。



图 6 新生淋巴管内皮细胞线粒体丰富，形态改变 EM×30000

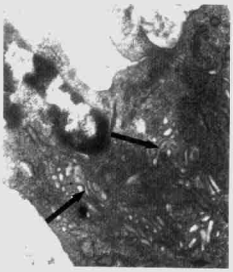


图 7 新生淋巴管内皮细胞高尔基体、内质网丰富 EM×25000

3 讨 论

我们前期研究观察到人乳腺浸润性导管癌裸鼠移植瘤内毛细血管相对较规则，呈圆形、椭圆形或肾形等，管壁内较少突起或凹陷，且管壁外有连续的基膜[5]。而本实验观察到在各移植瘤内均见到形态常不规则，管壁向腔内形成许多明显的突起或凹陷，有较多微绒毛（瓣膜样结构）或小梁状结构突向管腔，基底膜常不连续的管腔结构，具备毛细淋巴管的特征[6]。但在人体正常器官组织内极少见到壁较厚、腔较小的毛细淋巴管[6]，而本研究通过免疫组化染色光镜下观察到了较多这样的毛细淋巴管，上述差异提示移植瘤内淋巴管可能是新生的毛细淋巴管。我们进一步用电镜观察证实了这些淋巴管具有新生毛细淋巴管的特点：(1)管壁厚，管腔狭小，甚至见到管腔尚未良好开放的淋巴管；(2)内皮细胞间以紧密连接为多，开放连接少；(3)内皮细胞

维普资讯 http://www.cqvip.com

内高尔基复合体及粗面内质网丰富，提示其自身合成尚处于旺盛期；(4) 内皮细胞内质膜小泡含量甚少，胞吞和胞吐现象不明显；(5) 管壁外锚丝甚少，甚至几乎未见，而锚丝是微淋巴管与管周结缔组织连接必不可少的结构。以上均提示这部分微淋巴管结构尚未完全成熟、功能尚不完善。因此，可以认为，人乳腺癌裸鼠移植瘤内存在毛细淋巴管新生。

肿瘤内为什么会有新生淋巴管形成呢？Mouta 等[7]研究认为炎症及伴发的间质液体超载是机体淋巴管生成的基本因素。肿瘤由于生长旺盛甚或伴有不同程度的坏死，高浓度的蛋白和乳酸盐堆积致渗透压升高，且新生血管通透性较高，因而产生大量组织间液使实体瘤内液压升高，且产生的压力方向是由瘤内向瘤外的。肿瘤为保持其自身持续生长，就必需引导组织间液回流，因此瘤细胞就在这种有特定方向的液体压力引导下分泌一些促淋巴管生长因子如 VEGF-C 等，后者进一步在与其特异性受体 VEGFR-3 结合趋势的趋化力作用下诱导和促进瘤周及瘤内淋巴管内皮细胞进行有丝分裂增殖、迁移和管道化，进而形成新的淋巴管[8-10]。当新生淋巴管初期尚未与其周围组织建立起良好的联系时，无法或较少回流瘤组织间液，因而管内较少或缺乏液体、管腔内压较低，故管腔较小，管壁较厚。Isaka 等[11]研究发现刚长入肿瘤组织的新生淋巴管虽然具备瓣膜样结构、小梁状突起等特征性结构，但其功能尚不完善和成熟，管内液体能逆向流动。可能正是这种逆向流动促进了新生淋巴管芽的管道化和功能的逐步成熟，并相互连接形成微淋巴管网。形成适当的淋巴管网后，就能更有效地促进肿瘤组织间液的回流，从而减轻肿瘤细胞所受的压力，维持肿瘤细胞和组织的生长；这同时就在客观上增大了肿瘤细胞对宿主局部淋巴管的浸润和经淋巴道转移的可能性[12]。

由上可见，肿瘤淋巴管新生是在瘤内组织间液压力和促淋巴管生成因子趋化力的共同作用下发生和完成的。故生物机械力和细胞分子生物学机制是有机统一的。事实上，肿瘤的血管生成也同样符合这一原则。

Stacker 等[13]认为对于实质多、间质少的移植瘤组织，淋巴管的生成则是由肿瘤周围组织中的淋巴管内皮细胞增殖、迁移，以出芽的方式长入瘤组织。而 Boardma 等[9]发现在淋巴管长入肿瘤组织前，肿瘤内已有淋巴管内皮细胞的排列并向外推移。上述结果提示肿瘤淋巴管生成可能是双向的，这似乎正可以解释为何本实验发现 VEGFR-3 表达热区多位于肿瘤周边区，而表达较低的“冷区”多位于肿瘤中心区。此点有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Cunnick GH, Jiang WC, Gomez KF, et al. Lymphangiogenesis quantifi cation using quantitative PCR and breast cancer as a model [J].Biochem Biophys Res Commun,2001;288 (4):1043-1046.

[2] Detmar M,Skobe M, Hawighorst T, et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis [J]. Nat Med, 2001;7(2):192-198.

[3] Williams CS, Leek RD, Robson AM, et al. Absence of lymphangiogenesis and intratumoral lymph vessels in human metastatic breast cancer[J]. J Pathol, 2003;200(2):195-206.

[4] Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer [J]. AmJPathol,1995;147(1):9-19.

[5] 陈 鑫，吴诚义. 三氧化二砷对人乳腺癌裸鼠移植瘤的作用[J]. 中华实验外科杂志，2003；20(8):722-723.

[6] 成令忠，钟翠平，蔡文琴，主编. 现代组织学[M].第 1 版，上海：上海科学技术出版社，2003；701-703.

[7] Mouta C, Heroult M. Inflammatory triggers of lymphangiogenesis[J]. Lymphat Res Biol, 2003;1(3):201-218.

[8] Swartz MA, Kaipainen A, Netti PA, et al. Mechanics of interstitial-lymphatic fluid transport: theoretical foundation and experimental validation[J]. J Biomech, 1999;32(12):1297-1307.

[9] Boardman KC, Swartz MA. Interstitial flow as a guide for lymphangiogenesis [J]. Circ Res, 2003;92(7):801-808.

[10] Ingber DE. Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology [J]. Circ Res, 2002;91(10):877-887.

[11] Isaka N, Padera TP, Hagendoorn J, et al. Peritumor lymphatics induced by vascular endothelial growth factor-C exhibit abnormal function [J]. Cancer Res, 2004 ;64(13):4400-4404.

[12] Rubbia-Brandt L, Terris B, Giostra E,et al. Lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor-C expression correlate with malignant behavior in human pancreatic endocrine tumors [J]. Clin Cancer Res, 2004; 10(20):6919-6928.

[13] Stacker SA,Caesar C,Baldw M,et a1. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor or cells via the lymphatics[J]. Nat Med, 2001;7(2):186-191.