DOI:10.16016/j.2097-0927.202312031

乳腺癌淋巴结转移动物模型的建立及评价

周 钦[1,2],郭金铭[2,3],李星毅[2,4],成佳楠[2],贾馨竹[2],朱 波[1,2,3] 400054 重庆,重庆理工大学药学与生物工程学院[1];400037 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院肿瘤科,肿瘤免疫治疗重庆市重点实验室[2];400016 重庆,重庆医科大学免疫创新与转化研究院[3];610083 成都,中国人民解放军西部战区总医院肿瘤诊治中心[4]

[摘要] **目的** 建立不同乳腺癌淋巴结转移的动物模型,并评价其效果。**方法** 取6~8周龄BALB/c雌性小鼠60只,采用4T1乳腺癌细胞悬液注射小鼠不同部位等人工移植方法构建6种淋巴结转移动物模型($n=10$),另采用小鼠乳腺肿瘤病毒介导多瘤病毒中间T抗原(mouse mammary tumor virus-polyoma middle T antigen,MMTV-PyMT)转基因小鼠作为肿瘤自发淋巴结转移模型($n=5$),并从操作可行性、病理组织学观测、肿瘤生长速度及小鼠生存等多方面综合评价不同淋巴结转移模型的优劣特征。**结果** 7种转移模型方法中有4种成功建立淋巴结转移的动物模型,其中PyMT小鼠自发淋巴结转移模型临床复现情况最佳,成瘤率可达100%,但存在实验标准化差的弊端;后脚掌-腘窝淋巴结模型淋巴结发生转移速度最快,易操作且重复性高,成瘤率也可达100%,适合用于淋巴结转移相关研究;腿部-腹股沟淋巴结模型操作简单,重复率高,可达100%,但是其转移时间较后脚掌-腘窝淋巴结模型略长;腹股沟淋巴结-对侧淋巴结模型存在操作较难、荷瘤成功率仅为50%、重复性差的缺陷;另外3种荷瘤模型(舌下-颈内静脉肩胛舌骨肌淋巴结模型、骨髓内-腹股沟淋巴结模型及右上背皮-腋窝淋巴结模型)均未能在短时间内成功建立淋巴结转移模型,在病理切片中未观察到肿瘤细胞的存在。**结论** 后脚掌-腘窝淋巴结模型成瘤效果好,最适合用于开展乳腺癌淋巴结转移相关研究。

[关键词] 乳腺癌;淋巴结转移;动物模型

[中图法分类号] R-332;R73-37;R733.4 [文献标志码] A

Establishment and evaluation of an animal model for lymph node metastasis of breast cancer

ZHOU Qin[1,2], GUO Jinming[2,3], LI Xingyi[2,4], CHENG Jianan[2], JIA Qingzhu[2], ZHU Bo[1,2,3] [1]School of Pharmacy & Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing, 400054; [2]Institute of Cancer, Second Affiliated Hospital, Chongqing Key Laboratory of Immunotherapy, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400037; [3]Institute of Immunological Innovation and Translation, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [4]Tumor Diagnosis and Treatment Center, General Hospital of Western Theater Command, Chengdu, Sichuan Province, 610083, China

[**Abstract**] **Objective** To establish an animal model and evaluation system for lymph node metastasis of breast cancer. **Methods** A total of 60 female BALB/c mice (6~8 weeks old) were subjected, and then 6 models of lymph node metastasis ($n=10$) were constructed through injection at different parts in the mice with cell suspension of 4T1 breast cancer cells. Transgenic mice ($n=5$) of mouse mammary tumor virus-polyoma middle T antigen (MMTV-PyMT) were employed and served as model of spontaneous tumor metastasis. Then the advantages and disadvantages of different lymph node metastasis models were comprehensively evaluated

[基金项目] 重庆理工大学研究生创新项目(gzlcx20233397)

[通信作者] 朱 波,E-mail:bo.zhu@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

from multiple aspects, such as operability, histomorphology and pathological detection, tumor growth rate and mouse survival. **Results** Among the 7 metastasis models, 4 models of lymph node metastasis were successfully established. Among them, the PyMT mouse spontaneous tumorigenesis model showed the best clinical reproduction, with a tumorigenesis rate of up to 100%, but had a disadvantage of poor experimental standardization. The hind paw-popliteal lymph node model had the fastest lymph node metastasis, easy operation and high repeatability, and a tumorigenesis rate of 100%, indicating its suitable for lymph node metastasis related research. The thigh subcutaneous-inguinal lymph node model also successfully simulated lymph node metastasis, with simple operation and high repeatability, a tumorigenesis rate of up to 100%, but its metastasis time was slightly longer than the hind paw-popliteal lymph node model. The inguinal lymph node-contralateral lymph node model was also a successful lymph node metastasis model, but with difficult operation, only 50% tumor-bearing rate, and poor repeatability. Lymph node metastasis model was not successfully established in the other 3 tumor-bearing models (under the tongue-internal jugular scapular tongue muscle lymph node model, bone marrow-inguinal lymph node model and right upper back skin-axillary lymph node model) in a short time, with no tumor cells observed in the pathological sections. **Conclusion** Through the comprehensive comparison of multiple models, mouse hind paw-popliteal lymph node model is the most suitable for conducting related research.

[**Key words**] breast cancer; lymph node metastasis; animal models

Supported by the Postgraduate Innovation Program of Chongqing University of Technology (gzlcx20233397). Corresponding author: ZHU Bo, E-mail: bo.zhu@tmmu.edu.cn

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤,据估计,在较发达地区乳腺癌的发病率为 74.1%,病死率为 14.9%,是继肺癌之后的第二大常见恶性肿瘤和第五大致死疾病[1]。尽管现在的医疗水平提高了乳腺癌的检出率及治疗效果,但是仍然有部分患者不能从中获益,其主要原因是乳腺癌发生了淋巴结转移或远端转移[2]。淋巴结是机体重要的外周免疫器官,在免疫方面发挥着关键作用,当细菌或病毒入侵人体时,淋巴结能够抵抗及清除外来异物,减少机体出现感染性疾病的风险[3-4]。然而,在肿瘤转移过程中,癌细胞能够进入淋巴管再通过淋巴液迁移到引流淋巴结中,并且在引流淋巴结中增殖,使引流淋巴结发生病变,甚至还能从引流淋巴结中逃逸扩散到其他器官[5-7]。临床上,淋巴结的状态作为分期预后因素的诊断价值已被广泛重视,并且对淋巴结转移与否以及转移程度的评价将决定患者的后续治疗[8]。因此在肿瘤发生淋巴结转移后,淋巴结在抗肿瘤免疫中发挥的作用以及在淋巴结转移后如何对患者进行精准治疗仍需进一步研究[9]。

为了对乳腺癌淋巴结转移机制进行深入研究,目前急需建立稳定成熟的动物模型,重现临床上乳腺癌淋巴结转移的现象,以期后续开展肿瘤学相关基础研究解决临床上淋巴结转移这一实际难题。目前针对建立肿瘤淋巴结转移的动物模型主要有舌下接种法[10]、脚掌接种法[11-12]、睾丸内接种法、骨髓内接种法[13-14]、背部接种法[15]及耳部接种法等,基于其使用的实验动物的多样性及实验操作的复杂性和稳定性,本研究期望通过总结并优化实验技术,对小鼠的不同部位进行荷瘤建立不同的乳腺癌淋巴结转移模型,并通过操作可行性、肿瘤生长速度、淋巴结病理检测及小鼠生存等综合评价不同建模方式的优劣性,从而筛选出最稳定可靠的动物模型,为乳腺癌淋巴结转移的研究奠定基础,进而为临床准确评估患者风险和预后提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株及细胞培养 小鼠乳腺癌细胞系 4T1 采购于中国医学科学院基础医学研究所。所有细胞用富含 10%胎牛血清(Gibco)和 100 U/mL 青霉素/链霉素的 RPMI1640 培养基培养于含有 5% CO_2 的 37 ℃细胞培养箱中。所有细胞系定期进行支原体污染检测。

1.1.2 实验动物 BALB/c 雌性小鼠购自重庆滕鑫生物科技有限公司,共 60 只,小鼠乳腺肿瘤病毒介导多瘤病毒中间 T 抗原(mouse mammary tumor virus-polyoma middle T antigen, MMTV-PyMT)转基因小鼠(乳腺癌小鼠)购自赛业生物科技有限公司 5 只,6~8 周龄,体质量约为 20 g,用于开展实验相关研究。

1.2 方法

1.2.1 建模方法

1.2.1.1 PyMT小鼠自发淋巴结转移模型 MMTV-PyMT转基因小鼠模型是通过植入PyMT基因到乳腺特异性启动子腺病毒(MMTV)的表达载体中建立的。乳腺特异性启动子的作用使得PyMT基因在小鼠乳腺组织中高表达,从而使小鼠出现乳腺肿瘤的表型[16]。利用该小鼠自发乳腺癌的特性来观察其淋巴结转移规律,共5只PyMT小鼠。

1.2.1.2 腹股沟淋巴结-对侧淋巴结型[17] 将BALB/c小鼠后肢腹部和腿部备毛后,对小鼠进行麻醉处理,使用无菌剪刀和镊子在其腹股沟处剪开约1 cm的小口,取4T1细胞悬液5 μL,共计5×10^5个细胞,使用一次性无菌胰岛素注射针将细胞悬液接种于小鼠腹股沟处淋巴结中。在细胞悬液进入淋巴结后,可观察到淋巴结明显凸起,以此确定肿瘤细胞悬液在小鼠淋巴结内注射成功,共10只BALB/c小鼠。

1.2.1.3 腿部-腹股沟淋巴结模型[18] 取4T1细胞悬液100 μL,含5×10^5个细胞,使用一次性无菌胰岛素注射针皮下接种于BALB/c小鼠左后肢大腿处,共10只小鼠。

1.2.1.4 后脚掌-腘窝淋巴结模型[11] 取4T1细胞悬液50 μL,含5×10^5个细胞,使用一次性无菌胰岛素注射针皮下接种于BALB/c小鼠左后肢脚掌,共10只小鼠。

1.2.1.5 舌下-颈内静脉肩胛舌骨肌淋巴结模型[10] 用镊子将麻醉后的BALB/c小鼠舌头固定,取4T1细胞悬液50 μL,含5×10^5个细胞,使用一次性无菌胰岛素注射针接种于BALB/c小鼠舌左缘黏膜下,共10只小鼠。

1.2.1.6 骨髓内-腹股沟淋巴结模型[14] 取4T1细胞悬液8 μL,含5×10^5个细胞,使用一次性无菌胰岛素注射针接种于麻醉后的BALB/c小鼠后肢腿胫骨中,共10只小鼠。

1.2.1.7 右上背皮-腋窝淋巴结模型[15] 取4T1细胞悬液100 μL,含5×10^5个细胞,使用一次性无菌胰岛素注射针皮下接种于BALB/c小鼠右上背皮下,共10只小鼠。

1.2.2 样本处理 根据小鼠肿瘤的大小及小鼠的生存情况,决定处死小鼠取其引流淋巴结和对侧淋巴结的时间点。具体如下:①PyMT小鼠自发淋巴结转移模型在小鼠出生8周取材;②“后脚掌-腘窝淋巴结”模型、“右上背皮-腋窝淋巴结”模型和“骨髓内-腹股沟淋巴结”模型在荷瘤后17 d取材;③“舌下-颈内静脉肩胛舌骨肌淋巴结”模型在荷瘤后9 d取材;④“腹股沟淋巴结-对侧淋巴结”模型和“腿部-腹股沟淋巴结”模型在荷瘤后26 d取材。将小鼠处死后,取其引流淋巴结、对侧淋巴结及未经处理的小鼠淋巴结于组织固定液中固定,然后进行包埋、切片、染色,制作HE染色切片。

1.2.3 评价指标 均在荷瘤后7 d开始监测,每2天观察肿瘤的生长情况及小鼠状态。待小鼠生存状况差或肿瘤负荷大于2 000 mm^3时麻醉处死小鼠。以病理切片为标准观察淋巴结内细胞形态结构是否发生变化,以此确定是否发生淋巴结转移。同时根据构建不同淋巴结转移模型的操作可行性、成瘤率、小鼠生存等方面综合评价7种淋巴结转移模型的优劣性。

1.3 统计学分析

采用GraphPad Prism 8.2.1(441)软件进行分析。数据以$\bar{x}\pm s$表示,组间比较采用非配对t检验,$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PyMT小鼠自发淋巴结转移模型

图1A为PyMT小鼠自发淋巴结转移模型及取材部位,通过对病理切片进行分析后发现该淋巴结形成了明显的巢状肿瘤,结构破坏明显,滤泡数量减少,髓窦形态明显改变,可以看到淋巴细胞与肿瘤细胞形成了明显的分界线(图1B)。同时与未处理的对照组(Control)相比,PYMT小鼠前哨淋巴结(sentinel lymph node,SLN)质量增加3倍左右($P<0.01$,图1C)。结果提示MMTV-PyMT小鼠发生了肿瘤细胞淋巴结转移,且淋巴结转移率为100%,成瘤率也为100%,MMTV-PyMT转基因小鼠模型具有自发性转移、可重复性和接近病理状态的特点,提示其是一个理想的乳腺癌淋巴结自发转移研究模型。

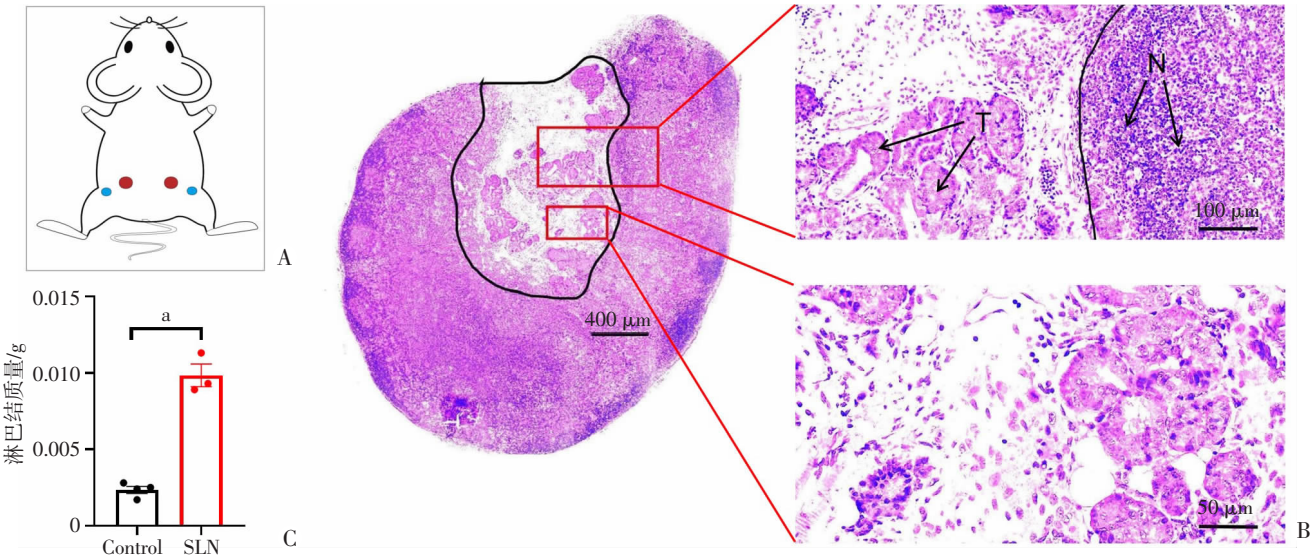
2.2 小鼠腹股沟淋巴结-对侧淋巴结模型

图2A为小鼠腹股沟淋巴结-对侧淋巴结模型的荷瘤及取材部位,通过对病理切片分析发现淋巴结内部组织已经坏死,并且形成较多空泡,淋巴结中存在大量的细胞核碎片;从细胞核形态上判读,应是肿瘤细胞来源,说明此时该模型已发生淋巴结转移,但由于取材时间太晚,肿瘤组织已经破坏,未能观察到界限清楚的肿瘤转移灶,此时的淋巴结已经随着肿瘤细胞的侵袭发展为淋巴瘤(图2B),与未处理的对照组(Control)相比,腹股沟淋巴结荷瘤小鼠的对侧淋巴结(contralateral lymph node, CLN)质量增加了2.5倍左右($P<0.01$,图2C),以上结果均说明该荷瘤模型在荷瘤后26 d发生了淋巴结的转移。但是在实验过程中发现该荷瘤模

型的操作方法难度较大,荷瘤成功率仅为 50%。因此,该模型的构建对操作者技术要求较高,重复性较低,易操作失误形成皮下瘤,不能成功建立模型。

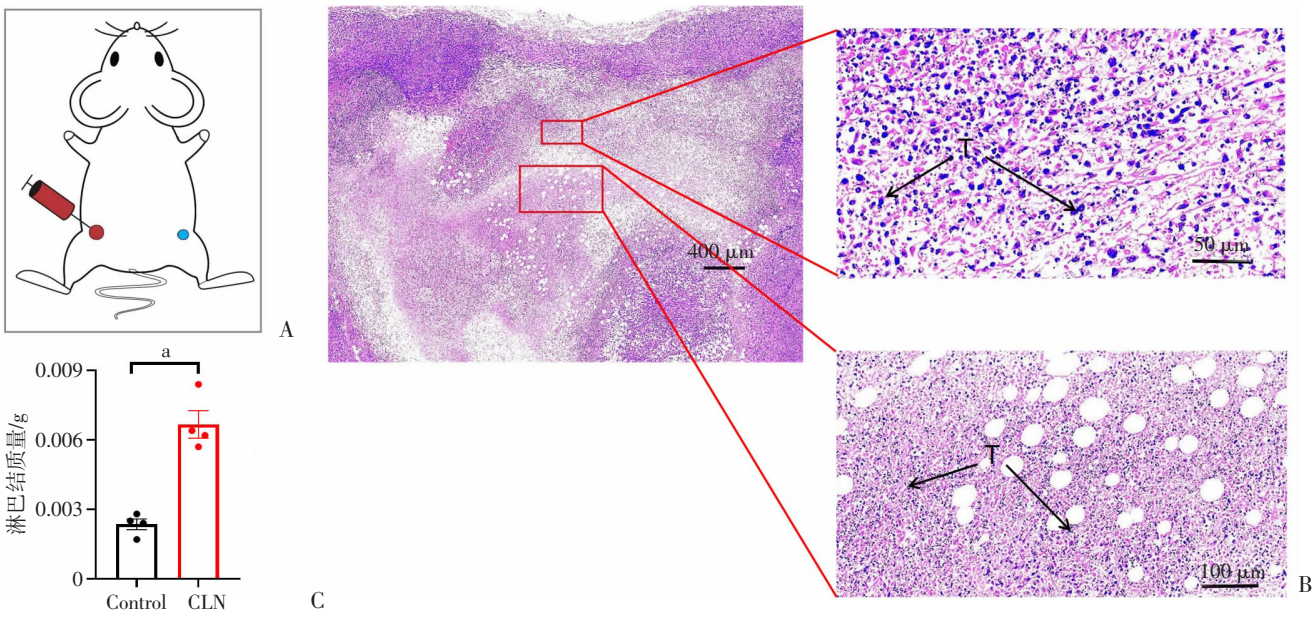
2.3　小鼠腿部-腹股沟淋巴结模型

图 3A 为小鼠腿部-腹股沟淋巴结模型的荷瘤及取材部位,通过对病理切片分析发现淋巴结已经被肿瘤细胞侵袭形成了肿瘤亮区。内部细胞结构发生改变,转移的乳腺癌细胞大小、形态差异大,没有形成腺体样结构,但明显不同于正常的淋巴细胞(图 3B)。对病理切片进一步分析发现,随着肿瘤细胞的侵袭在淋巴结内形成了 2 个转移灶,如图 3B 中黑色实线圈画部分所示。同时通过对比前哨淋巴结(SLN)和对侧淋巴结(CLN)质量发现引流淋巴结的质量显著增加($P<0.01$,图 3C)。说明小鼠后肢皮下荷瘤 26 d 后肿瘤细胞会发生远处转移,重塑淋巴结结构和细胞组成,最终形成淋巴结转移灶。同时该模型操作简单,成瘤率为 100%,重复性好,但发生转移的时间较长,不利于后续实验的进行。



A:PyMT 自发乳腺癌小鼠模式图　●:肿瘤部位;●:取材部位;B:淋巴结转移病理切片　T:肿瘤细胞;N:正常细胞;C:淋巴结质量　a:$P<0.01$

图 1　PyMT 小鼠自发淋巴结转移模型

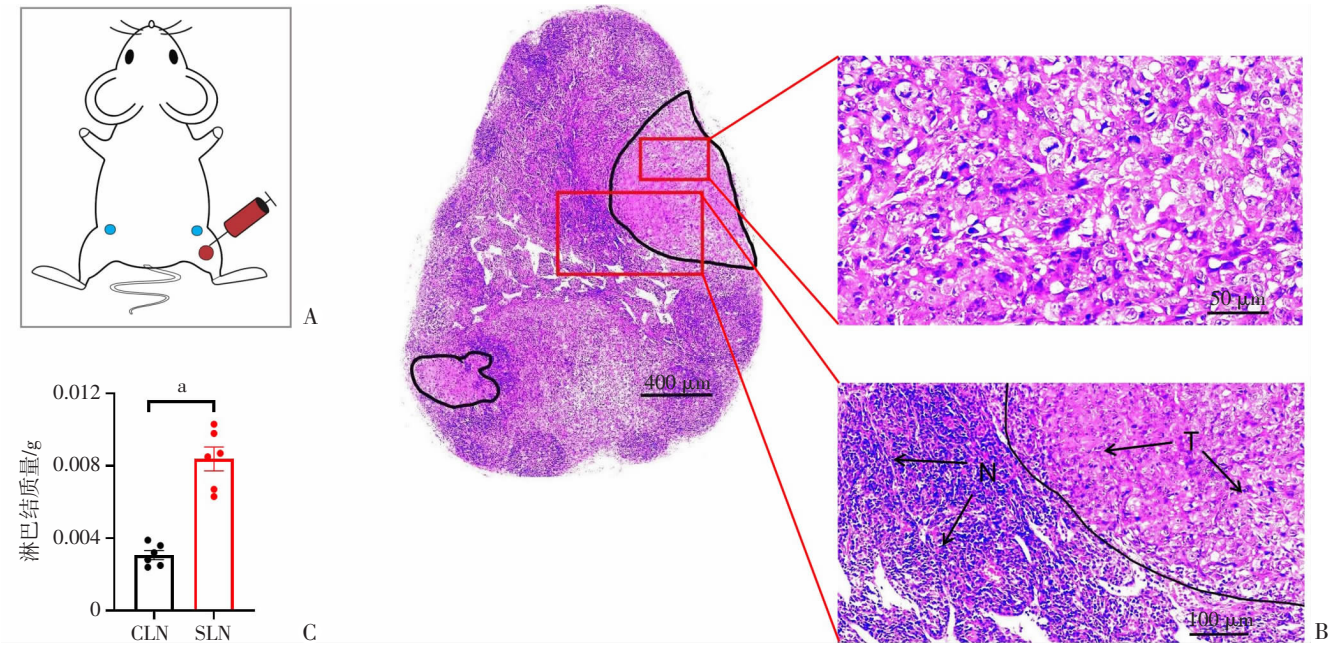


A:荷瘤模型图　●:荷瘤部位;●:取材部位;B:淋巴结转移病理切片　T:肿瘤细胞;C:淋巴结质量　a:$P<0.01$

图 2　小鼠腹股沟淋巴结-对侧淋巴结模型

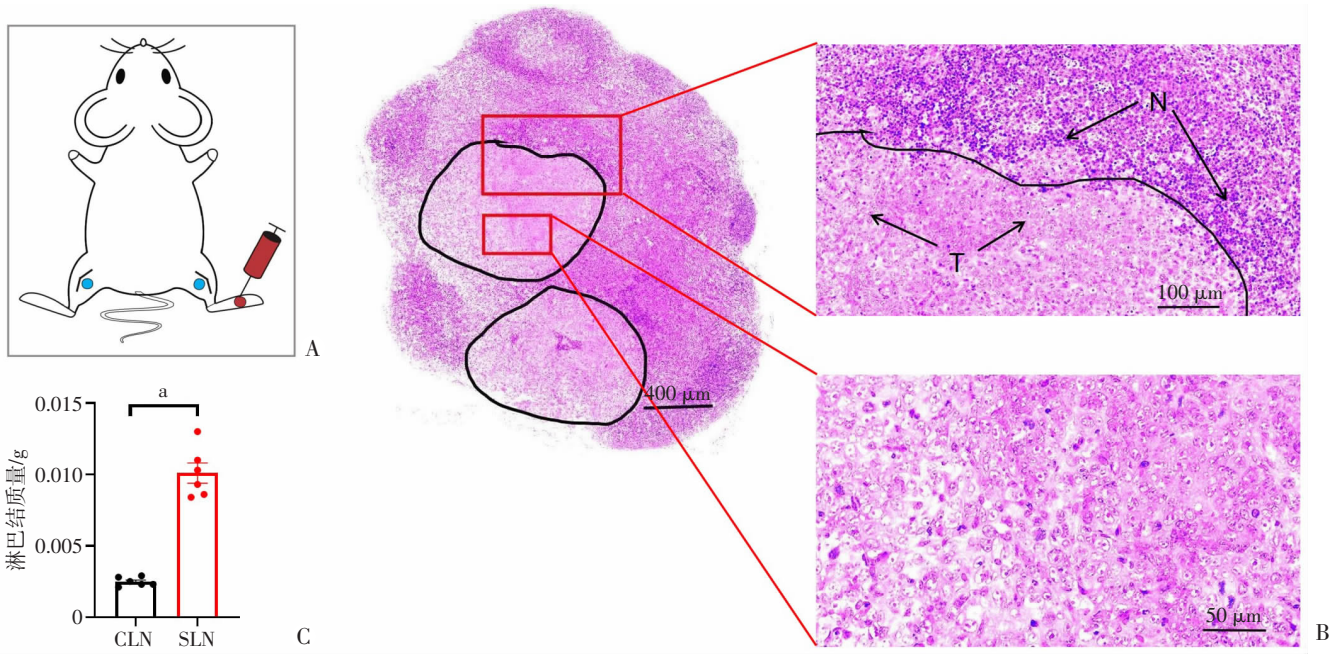
2.4　小鼠后脚掌-腘窝淋巴结模型

图 4A 为小鼠后脚掌-腘窝淋巴结模型的荷瘤及取材部位,结果显示在腘窝处的淋巴结中出现了 2 处成片的肿瘤亮区,说明肿瘤细胞在淋巴结内形成了 2 处转移灶(图 4B)。该部位的细胞形态不规则,说明转移的乳腺癌细胞形态差异大,虽然没有形成腺体样结构,但细胞表面成泡状,与正常淋巴细胞的结构和形态完全不同。同时发现前哨淋巴结(SLN)质量较对侧淋巴结(CLN)质量显著增加($P<0.01$,图 4C)。这也证明通过脚掌荷瘤建立向淋巴结转移的小鼠模型是可行的。



A:荷瘤模型图　●:荷瘤部位;●:取材部位;B:淋巴结转移病理切片　T:肿瘤细胞;N:正常细胞;C:淋巴结质量　a:$P<0.01$

图 3　小鼠腿部-腹股沟淋巴结模型



A:荷瘤模型图　●:荷瘤部位;●:取材部位;B:淋巴结转移病理切片　T:肿瘤细胞;N:正常细胞;C:淋巴结质量　a:$P<0.01$

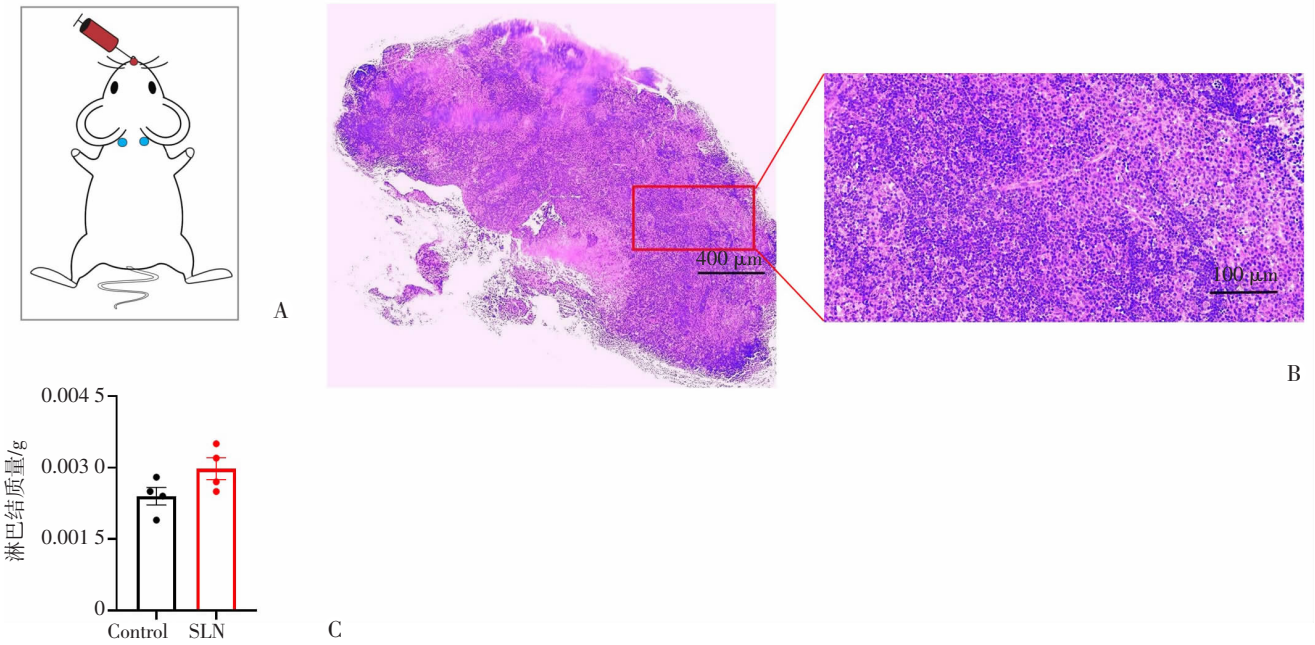
图 4　小鼠后脚掌-腘窝淋巴结模型

2.5 小鼠舌下-颈内静脉肩胛舌骨肌淋巴结模型

图 5A 为小鼠舌下-颈内静脉肩胛舌骨肌淋巴结模型的荷瘤及取材部位,根据病理切片的结果显示,小鼠淋巴结正常形态存在,无肿瘤细胞侵袭(图 5B),同时荷瘤小鼠的前哨淋巴结(SLN)与正常小鼠淋巴结(Control)质量无明显变化(图 5C)。此外,该荷瘤模型成瘤后易引起小鼠进食困难,从而导致小鼠消瘦,在荷瘤的第 9 天造成小鼠死亡,存活时间短不利于后续其他实验的进行。

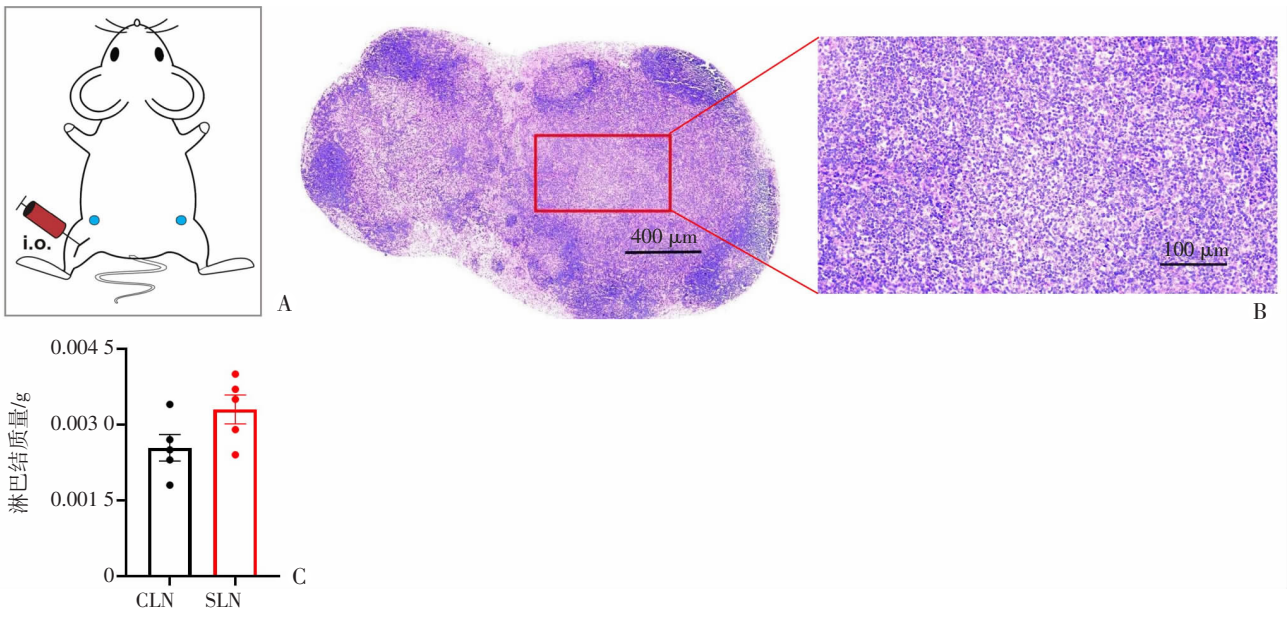
2.6 小鼠骨髓内-腹股沟淋巴结模型

图 6A 为小鼠骨髓内-腹股沟淋巴结模型的荷瘤及取材部位,结果显示小鼠腹股沟淋巴结未发生变化,其结构完整,滤泡分布均匀(图 6B),前哨淋巴结(SLN)与对侧淋巴结(CLN)质量无明显变化(图 6C),说明此种方法在构建淋巴结转移小鼠模型上不易成功。该种方法的成瘤率为 70%,较其他荷瘤方式成瘤率低。



A:荷瘤模型图 ●:荷瘤部位;●:取材部位;B:淋巴结转移病理切片;C:淋巴结质量

图 5 小鼠舌下-颈内静脉肩胛舌骨肌淋巴结模型



A:荷瘤模型图 ●:取材部位;B:淋巴结转移病理切片;C:淋巴结质量

图 6 小鼠骨髓内-腹股沟淋巴结模型

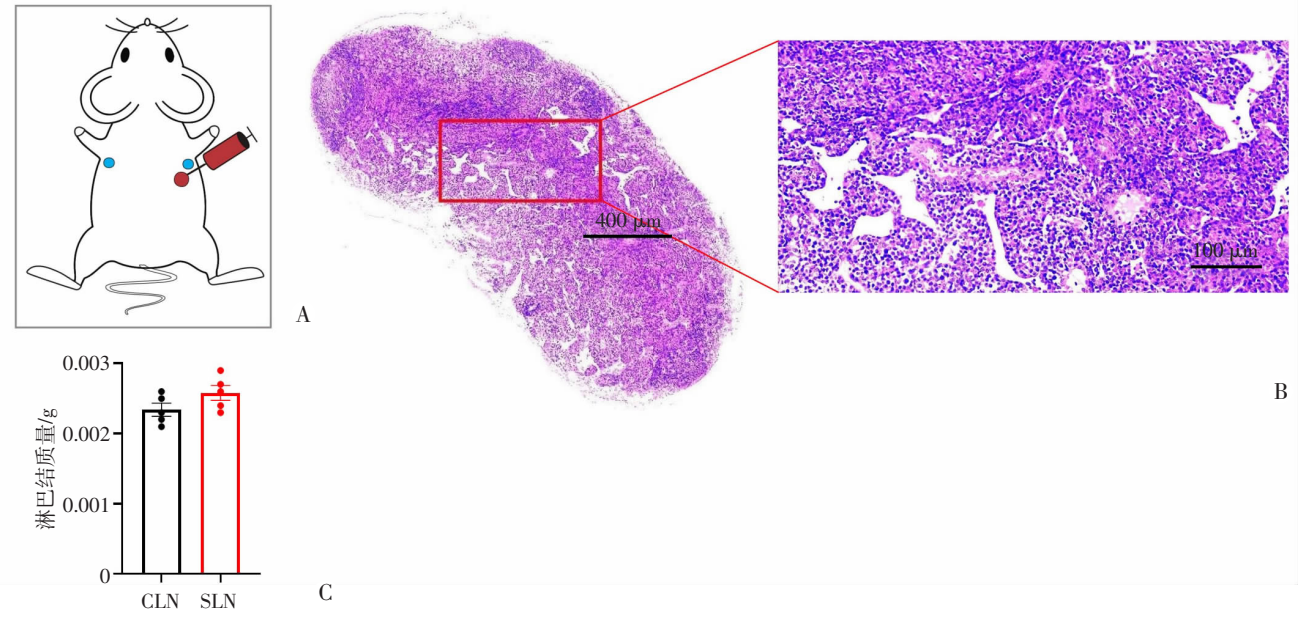
2.7 小鼠右上背皮-腋窝淋巴结模型

图 7A 为小鼠右上背皮-腋窝淋巴结模型的荷瘤及取材部位,结果显示小鼠腋窝处淋巴结结构形态完整,淋巴细胞未发生变化(图 7B),同时前哨淋巴结(SLN)的质量与对侧淋巴结(CLN)相比未发生显著变化(图 7C)。此荷瘤方式简单,成瘤率可达 100%,但肿瘤细胞向腋窝淋巴结的侵袭较缓慢,在荷瘤后 17 d 依然未见淋巴结结构、形态发生改变,细胞间质也未见明显变化。

3 讨论

乳腺癌是常见的恶性肿瘤之一,严重威胁女性的生命健康,2022 年美国新增 287 850 例侵袭性乳腺癌,其中因乳腺癌而死亡的患者约 43 250 例[19]。乳腺癌发生转移与否决定了患者的治疗方法及预后情况,但目前对于乳腺癌的转移机制尚未明确,而乳腺癌最常见的转移部位便是腋窝淋巴结。为深入了解乳腺癌淋巴结的转移机制,目前急需建立稳定、高效、易重复的乳腺癌淋巴结转移模型。

肿瘤转移模型主要包括自发性肿瘤转移模型、移植性肿瘤转移模型和诱发性肿瘤转移模型。其中诱发性转移模型的肿瘤发生转移率较低;移植性肿瘤转移模型虽然发生转移率高、方法简单,但是其对手术无菌操作要求严格且成瘤周期较长,更重要的是个体差异较大,不适用于所有的实验动物。因此,在本实验中主要选择了自发性肿瘤转移模型进行研究。在所采用的 7 种荷瘤模型中,PyMT 小鼠自发淋巴结转移模型的淋巴结转移率为 100%,可形成巢样乳腺组织结构,同时其自发成瘤导致淋巴结转移与临床患者的现象更加吻合,直接选用 PyMT 小鼠就能满足实验要求,无需其他实验操作,但选择该模型进行研究时耗费的成本远高于其他自发性肿瘤转移模型,同时该模型用于研究肿瘤淋巴结转移时肿瘤负荷较大,且可能形成多个肿瘤,不利于后续相关实验的进行。因此,为了找到更合适的淋巴结转移模型,本研究从进行实验的成本、重复性及转移率多方面出发,建立了另外 6 种不同的自发性肿瘤转移模型,根据小鼠的生存状态及肿瘤的生长大小决定处死小鼠、取其淋巴结的时间点。由于舌下-颈内静脉肩胛舌骨肌淋巴结模型的小鼠在成瘤后进食困难、消瘦,易造成小鼠模型的死亡,因此该模型在荷瘤后第 9 天取颈内静脉肩胛舌骨肌淋巴结,病理切片中未观察到肿瘤侵袭淋巴结的原因可能是取材过早;根据肿瘤生长大小,后脚掌-腘窝淋巴结模型、右上背皮-腋窝淋巴结模型和骨髓内-腹股沟淋巴结模型在荷瘤后 17 d 取其引流淋巴结,经病理切片分析后发现后脚掌-腘窝淋巴结模型已发生肿瘤淋巴结转移;而右上背皮-腋窝淋巴结模型和骨髓内-腹股沟淋巴结模型并未发生淋巴结转移,原因可能是观察时间太短,或是不同部位引流淋巴结的影响导致在短时间内无法形成淋巴结转移。腹股沟淋巴结-对侧淋巴结模型和腿部-腹股沟淋巴结模型则是在荷瘤后 26 d 取其淋巴结,根据病理切片显示这 2 个模型的引流淋巴结中均已发生肿瘤



A:荷瘤模型图 ●:荷瘤部位;●:取材部位;B:淋巴结转移病理切片;C:淋巴结质量

图 7 小鼠右上背皮-腋窝淋巴结模型

淋巴结转移,说明当肿瘤发展到晚期时发生淋巴结转移的可能性显著增加,即使是在淋巴结这种免疫器官中荷瘤也无法消灭肿瘤细胞,发生肿瘤淋巴结的转移,结果证明腹股沟淋巴结-对侧淋巴结模型更适用于当淋巴结被肿瘤细胞侵袭后,其在抗肿瘤免疫中发挥的作用等相关研究;而腿部-腹股沟淋巴结模型虽然也能够构建淋巴结转移模型,但其发生转移的时间点相对靠后,接近肿瘤晚期,不利于进行其他相关研究。

综上所述,从实验成本、重复性、成瘤率、操作可行性及病理检测多方面综合考虑认为后脚掌-腘窝淋巴结模型最适合用于乳腺癌淋巴结转移基础实验研究,同时其不仅仅局限于乳腺癌淋巴结转移模型的构建,在其他瘤种中同样适用。总之,在进行肿瘤淋巴结转移相关实验研究时,根据实验需求选择合适的动物模型及合适的时间点对于实验的顺利进行至关重要。

参考文献:

[1] MOMENIMOVAHED Z, SALEHINIYA H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in theworld [J]. Breast Cancer, 2019, 11: 151-164. DOI: 10.2147/BCTT.S176070.

[2] BEN-DROR J, SHALAMOV M, SONNENBLICK A. The history of early breast cancer treatment[J]. Genes, 2022, 13(6): 960. DOI: 10.3390/genes13060960.

[3] WANCKET L M. Regional draining lymph nodes: considerations for medical device studies[J]. Toxicol Pathol, 2019, 47(3): 339-343. DOI: 10.1177/01926 23318811075.

[4] SLEEMAN J P, THIELE W. Tumor metastasis and the lymphatic vasculature[J]. Int J Cancer, 2009, 125(12): 2747-2756. DOI: 10.1002/ijc.24702.

[5] HOSHIDA T, ISAKA N, HAGENDOORN J, *et al*. Imaging steps of lymphatic metastasis reveals that vascular endothelial growth factor-C increases metastasis by increasing delivery of cancer cells to lymph nodes: therapeutic implications[J]. Cancer Res, 2006, 66(16): 8065-8075. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1392.

[6] JONES D, PEREIRA E R, PADERA T P. Growth and immune evasion of lymph node metastasis[J]. Front Oncol, 2018, 8: 36. DOI: 10.3389/fonc.2018.00036.

[7] PENG J M, SU Y L. Lymph node metastasis and tumor-educated immune tolerance: potential therapeutic targets against distant metastasis[J]. Biochem Pharmacol, 2023, 215: 115731. DOI: 10.1016/j.bcp.2023.115731.

[8] HAN M, KANG R R, ZHANG C Q. Lymph node mapping for tumor micrometastasis[J]. ACS Biomater Sci Eng, 2022, 8(6): 2307-2320. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.2c00111.

[9] DU BOIS H, HEIM T A, LUND A W. Tumor-draining lymph nodes: At the crossroads of metastasis and immunity[J]. Sci Immunol, 2021, 6(63): eabg3551. DOI: 10.1126/sciimmunol.abg3551.

[10] OHNO J, IWAHASHI T, OZASA R, *et al*. Solitary neurofibroma of the gingiva with prominent differentiation of Meissner bodies: a case report[J]. Diagn Pathol, 2010, 5: 61. DOI: 10.1186/1746-1596-5-61.

[11] GARCIA-SILVA S, BENITO-MARTIN A, NOGUES L, *et al*. Melanoma-derived small extracellular vesicles induce lymphangiogenesis and metastasis through an NGFR-dependent mechanism[J]. Nat Cancer, 2021, 2(12): 1387-1405. DOI: 10.1038/s43018-021-00272-y.

[12] CARR I. Experimental lymphatic metastasis[J]. J Microsc, 1983, 131(2): 211-220. DOI: 10.1111/j.1365-2818.1983.tb04247.x.

[13] WU Y T, AI H B, XI Y H, *et al*. Osteoclast-derived apoptotic bodies inhibit naive $CD8^+$ T cell activation via Siglec15, promoting breast cancer secondary metastasis[J]. Cell Rep Med, 2023, 4(9): 101165. DOI: 10.1016/j.xcrm.2023.101165.

[14] MA Q Y, LIANG M M, WU Y T, *et al*. Small extracellular vesicles deliver osteolytic effectors and mediate cancer-induced osteolysis in bone metastatic niche[J]. J Extracell Vesicles, 2021, 10(4): e12068. DOI: 10.1002/jev2.12068.

[15] HORVATHOVA L, TILLINGER A, PADOVA A, *et al*. Sympathectomized tumor-bearing mice survive longer but develop bigger melanomas[J]. Endocr Regul, 2016, 50(4): 207-214. DOI: 10.1515/enr-2016-0022.

[16] OTSUKA Y, OIKAWA T, YOSHINO H, *et al*. Frequent overexpression of AMAP1, an Arf6 effector in cell invasion, is characteristic of the MMTV-PyMT rather than the MMTV-Neu human breast cancer model[J]. Cell Commun Signal, 2018, 16(1): 1. DOI: 10.1186/s12964-017-0212-z.

[17] WANG Q, WANG Z, SUN X X, *et al*. Lymph node-targeting nanovaccines for cancer immunotherapy[J]. J Control Release, 2022, 351: 102-122. DOI: 10.1016/j.jconrel.2022.09.015.

[18] STRIBBLING S M, RYAN A J. The cell-line-derived subcutaneous tumor model in preclinical cancer research [J]. Nat Protoc, 2022, 17(9): 2108-2128. DOI: 10.1038/s41596-022-00709-3.

[19] GIAQUINTO A N, SUNG H, MILLER K D, *et al*. Breast cancer statistics, 2022[J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(6): 524-541. DOI:10.3322/caac.21754.

(收稿:2023-12-06;修回:2024-02-01)

(编辑 汪勤俭)