

As₂O₃ 联合 Aspirin 对 615 小鼠移植性前胃癌淋巴道转移的影响

于丽丽¹, 李琳琳², 柳红³

(1.浙江省人民医院, 浙江 杭州 310014; 2.徐州医学院第一附属医院, 江苏 徐州 221002; 3.徐州医学院, 江苏 徐州 221002)

摘要: [目的] 观察 As₂O₃ 和 Aspirin 联合应用对 615 小鼠前胃癌侵袭、淋巴管生成及淋巴道转移的影响。[方法] 建立小鼠前胃癌淋巴道移植瘤模型, 用 As₂O₃、Aspirin 单独及联合作用后, 测量各组小鼠体重、瘤重, 计算肿瘤抑制率并计数瘤组织微淋巴管密度 (LMVD)。[结果] 与 NS 组相比, 各治疗组 615 小鼠移植瘤生长均受抑制, Aspirin 组抑瘤率为 15.4%, As₂O₃ 组抑瘤率为 43.8%, 减半联合组为 45.6%, 联合组为 60.4%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。淋巴结内瘤组织转移抑制率 As₂O₃ 组为 22.4%, 减半联合组和联合组分别为 28.6% 和 50.0%。联合治疗组与减半联合组、Aspirin 组、As₂O₃ 组及 NS 组相比, LMVD 计数均显著减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。[结论] As₂O₃ 与 Aspirin 联合应用可抑制小鼠前胃癌移植瘤的生长、侵袭和淋巴道转移。

关键词: As₂O₃; Aspirin; 胃肿瘤; 淋巴道转移

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)10-0776-07

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2013.10.B008

The Effect of As₂O₃ Combined with Aspirin on Infiltration and Lymphatic Metastasis of MFC in 615 Inbreeding Mice

YU Li-li¹, LI Lin-lin², LIU Hong³

(1. Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, China; 2. The First Affiliated Hospital of Xuzhou Medical School, Xuzhou 221002, China; 3. Xuzhou Medical School, Xuzhou 221002, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of As₂O₃ in combination with Aspirin on the infiltration and lymphatic metastasis of highly metastatic mouse forestomach squamous carcinoma (MFC) in 615 inbreeding mice. [Methods] We set up 615 high-metastatic models of mouse tumor, giving different concentrations of As₂O₃ and Aspirin. The body weight, tumour weight were measured and the tumor inhibition rate was calculated, and the microlymphatic vessel density (LMVD) was counted. [Results] The weight of tumors in 615-strain mice treated with As₂O₃ combined aspirin was significantly lower than that of the others groups ($P < 0.05$). The inhibition rate of tumor weight was 15.4% in Aspirin group, 43.8% in As₂O₃ group, 45.6% in the half-dose combination group, 60.4% in combination group. The tumor metastasis inhibition rate in lymph node, As₂O₃ group was 22.4%, half-dose combination group was 28.6%, and combination group was 50.0%. LMVD in tumor tissues treated with drugs were evidently lower than that in the saline group ($P < 0.05$), especially the combination group. [Conclusion] As₂O₃ in combination with Aspirin could inhibit the growth, invasion and lymphatic metastasis of tumor tissue in 615-strain mice.

Subject words: As₂O₃; Aspirin; gastric neoplasms; lymphatic metastasis

三氧化二砷 (arsenic trioxide, As₂O₃) 系中药砒霜的主要成分, 药用历史悠久。自成功应用于血液系统肿瘤之后, 国内外学者发现其在实体肿瘤方面亦取

得良好的抗癌作用^[1]。阿司匹林 (Aspirin) 属于非甾体抗炎药 (nonsteroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs), 临床广泛用于消炎、解热、镇痛及抗风湿病, 近年来发现其具有一定的抗肿瘤作用^[2]。本实验将 As₂O₃ 和 Aspirin 联合应用于 615 系小鼠移植性前胃癌模型, 观察两药单用及联合应用在肿瘤浸润、

通讯作者: 柳红, 教授, 硕士生导师, 硕士; 徐州医学院病理教研室, 江苏省徐州市泉山区淮海西路 84 号 (221006); E-mail: hongliu04@yahoo.com

收稿日期: 2013-08-14; **修回日期:** 2013-09-14

淋巴管形成和淋巴道转移等方面的影响,为肿瘤治疗提供新的思路及理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

阿司匹林纯品(纯度 $\geq 99.0\%$)购自美国 Sigma 公司,亚砷酸氯化钠注射液(规格 10ml:10mg)购自哈尔滨伊尔达药业有限公司。LYVE-1 抗体(ab14917)购自英国 Abcam 公司。

1.1.2 瘤株及来源

小鼠前胃鳞癌(MFC)细胞株,由中国医学科学院基础医学研究所病理室提供,源自甲基卞基亚硝胺灌胃诱发的小鼠前胃癌,为分化较好的鳞状细胞癌,具有血道和淋巴道双重转移潜力,并侵袭周围肌肉组织。

1.1.3 实验动物

清洁级近交系 6~7 周 615 小鼠,共 45 只,雌雄不限,体重(24 $\pm$ 2)g,购自天津血液研究所实验动物中心(动物许可证号 SCXK(津)2004-0001)。

1.2 实验方法

1.2.1 肿瘤细胞体内传代

复苏液氮冻存的 MFC 细胞株,接种于 615 小鼠右侧腋窝皮下。待肿瘤长至 1~2.5cm 时,断颈处死小鼠并无菌条件下完整剥离,取生长良好的瘤组织,在预冷的无血清 1640 培养基中冲洗、剪碎、反复吹打、过滤,最终制成浓度为 $4 \times 10^6/\text{ml}$ 的单细胞悬液,采用此法反复接种 4 次以纯化肿瘤。

1.2.2 小鼠足垫瘤细胞接种

将无菌制备的浓度为 $4 \times 10^6/\text{ml}$ 肿瘤细胞悬液,按 0.05ml/只接种(注意避免细胞悬液外溢)于小鼠右侧后肢足垫内侧皮下,建立移植瘤动物模型。接种后每天观察小鼠饮食、活动等一般情况,接种后 5d,以接种部位皮肤红肿明显认定为成瘤。

1.2.3 实验分组及给药

成瘤后采用随机数字表法将小鼠随机分 5 组: I: NS 组、II: Aspirin 组、III: As_2O_3 组、IV: As_2O_3 和 Aspirin 剂量减半联合组、V: As_2O_3 和 Aspirin 联合组,每组 9 只,各组小鼠均用苦味酸标记、编号。I、IV、V 均采用灌胃(i.g)及腹腔注射(i.p)两种给药方

式,II 采用灌胃给药(i.g),III 采用腹腔注射给药(i.p); 给药剂量根据小鼠体重计算:

I: NS 80mg/(kg·d) i.g + NS 2mg/(kg·d) i.p;

II: Aspirin 80mg/(kg·d) i.g;

III: As_2O_3 2mg/(kg·d) i.p;

IV: Aspirin 40mg/(kg·d) i.g + As_2O_3 1mg/(kg·d) i.p;

V: Aspirin 80mg/(kg·d) i.g + As_2O_3 2mg/(kg·d) i.p。

连续用药 14d,给药期间每日观察各组小鼠饮食、排便及活动情况、精神状态,并隔日称量小鼠体重并记录,观测小鼠足垫移植瘤生长情况。

1.2.4 肿瘤重量及瘤重抑制率

末次给药后 24h 处死小鼠^[3],按同等长度斩断小鼠双足,以荷瘤侧足垫重量减去对侧正常足垫重量,计算移植瘤重量。

1.2.5 肿瘤组织侵袭情况

常规病理制片,观察侵袭情况,小鼠足垫皮下移植瘤侵袭程度分级参考以下判断标准^[4]:侵袭 I 级:瘤组织周围轻度水肿,有少量炎症细胞浸润,瘤细胞开始增殖并单个癌细胞开始向周围组织侵袭,间有核分裂相;侵袭 II 级:瘤细胞生长活跃,核分裂相多见,其周围组织水肿明显,有大量炎症细胞包绕瘤体,成组的癌细胞侵入肌组织,未见肌肉组织变性和萎缩;侵袭 III 级:瘤细胞广泛向肌肉组织内侵入,肌细胞出现明显变性和萎缩,瘤体周围水肿和炎症反应更加明显,瘤体中心开始出现坏死,癌细胞已侵入真皮内,但表皮无萎缩或变薄,并可出现肺转移;侵袭 IV 级:瘤细胞广泛侵袭皮下组织,有的侵及表皮,使表皮变薄或溃破,大部分肌肉组织和部分骨组织被侵袭,瘤体中心大片坏死,肺转移数量增加,淋巴结转移。

1.2.6 肿瘤转移情况

解剖小鼠,寻找接种肿瘤侧腋窝、髂动脉旁及腹主动脉旁淋巴结,10%中性缓冲福尔马林固定,HE 染色镜下观察淋巴结转移情况,淋巴结内瘤组织学转移分级判断标准^[5]:阴性:表示淋巴结内未发现癌细胞;阳性:表示在淋巴结内的边缘窦内有单个或散在分布的癌细胞,但尚未形成转移灶;转移 I 级:表示在淋巴结的边缘窦内有成堆的癌细胞,形成了小的转移灶,时见核分裂相;转移 II 级:在淋巴结的边缘窦及中间窦内已形成明显的转移灶;转移 III 级:淋巴结大部分由癌细胞所取代,转移灶内常见坏死;转

移Ⅳ级:一个以上淋巴结内有癌转移,形成广泛性转移。

1.2.7 免疫组化 PV 法检测 LYVE-1

以 LYVE-1 标记淋巴管内皮细胞检测 LMVD, LYVE-1 检测采用免疫组化 PV-6001 法,LYVE-1 稀释浓度为 1:400,以内皮细胞胞浆染成棕色或棕黄色为阳性标准。

采用“热点”法评价 LMVD^[6]:先在低倍镜下选取肿瘤组织中 LYVE-1 染色阳性高密度区(hot spot),再在高倍视野(×200 和×400)下计数微脉管数目。棕染的具有清晰管腔结构,或两个及两个以上聚集的淋巴管内皮细胞簇均可作为一个计数单位,单个内皮细胞不计数。微淋巴管不一定要有完整的管状结构,只要结构不相连,其分支结构也可作为一个计数单位。每张切片随机观察 5 个视野,然后求其平均值作为该标本的 LMVD。

1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理,计量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$),组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较采用 q 检验(Student-Newman-Kewls);多个率的比较采用卡方检验;相关性检验用 Pearson 相关分析,相关性用相关系数 r 表示。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 As₂O₃、Aspirin 单用药、联合及减半联合应用对 615 小鼠移植性前胃癌生长的影响

2.1.1 各组 615 小鼠存活情况

用药过程中,除 As₂O₃ 组外,其余各组小鼠均有死亡现象,以 NS 组死亡数量最多,其次为 Aspirin 组和减半联合组,死亡原因可能主要为实验历时较长,末期小鼠恶病质所致,个别小鼠因灌胃操作失误致死。

2.1.2 镜下观察移植瘤形态学特征

镜下见癌巢由活跃增生的鳞状上皮细胞构成,癌细胞界限清楚,有细胞间隙,但不易看到间桥,瘤细胞呈多形性,且大小不一,核质比例大,核圆形、分叶状或不规则形,细胞核大,核仁清楚,偶见双核及多核,核染色质

多,核膜厚。在癌巢中可以看到少数散在的巨噬细胞。其中 NS 组瘤细胞生长良好,丰富且排列紧密,核大而深染,异型明显,核分裂相多见,并可见散在的瘤巨细胞。肿瘤中央坏死区伴大量炎性细胞浸润; Aspirin 组和 As₂O₃ 组、剂量减半联合组、联合组均出现颗粒状红染的坏死区域,内有细胞碎片及炎细胞浸润,并可见细胞皱缩,胞质密集,核固缩,染色加深、碎裂或消失。

2.1.3 肿瘤重量及瘤重抑制率

结果显示,NS 组移植瘤平均瘤重明显大于其他各治疗组,As₂O₃ 和 Aspirin 单独及两药联用组肿瘤重量均降低,以联合组最小,与其他各组相比差别均有统计学意义($P<0.05$),且抑瘤率最高(60.4%)(Table 1, Figure 1)。

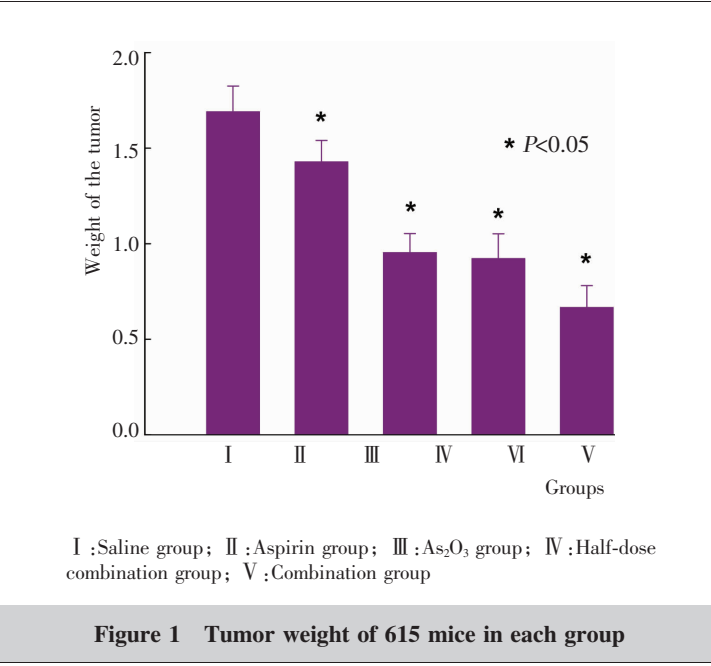
2.2 As₂O₃、Aspirin 单用药、联合及减半联合应用对 615 小鼠移植性前胃癌侵袭的影响

NS 组、Aspirin 组荷瘤小鼠侵袭程度多为Ⅲ级、

Table 1 Inhibitory action of As₂O₃ and Aspirin on tumor mass($\bar{x}\pm s$)

Groups	n	Tumor weight (g)	Inhibitory rate (%)
Saline group	6	1.69±0.13	—
Aspirin group	7	1.43±0.11*	15.4
As ₂ O ₃ group	9	0.95±0.09*△	43.8
Half-dose combination group	7	0.92±0.13*△	45.6
Combination group	8	0.67±0.11*△▽◇	60.4

Note: One-way ANOVA, $F=89.294$, $P=0.0003$; *vs Saline group $P<0.05$; △vs Aspirin group $P<0.05$; ▽vs As₂O₃ group $P<0.05$; ◇vs Half-dose combination group $P<0.05$.



Ⅳ级,足垫肌组织变性萎缩明显,部分肿瘤侵及表皮,个别小鼠足垫肿瘤破溃、结痂,并侵袭骨组织,造成骨组织结构破坏,部分并见有肺组织转移;As₂O₃组、减半联合组侵袭程度多为Ⅱ级、Ⅲ级,联合组侵袭程度较轻微,多为Ⅱ级,足垫肌组织内可见瘤细胞侵袭,但变性和萎缩不明显,未见有肺组织转移。研究结果显示 MFC 细胞足垫皮下移植后肿瘤达到Ⅲ~Ⅳ级侵袭时方出现转移,表明局部肿瘤侵袭程度与转移间具有一定关系。

2.3 As₂O₃、Aspirin 单用药、联合及减半联合应用对 615 小鼠移植性前胃癌 LMVD 计数的影响

癌组织微淋巴管形态不规则,部分淋巴管无明显管腔,表现为内皮细胞簇,分布以肿瘤组织边缘处较多见,NS 组瘤体内新生淋巴管相对丰富且淋巴管腔较大,其内发现较多转移瘤细胞(Figure 2)。平均 LMVD 计数显示,各治疗组皮下移植瘤 LMVD 个数均低于 NS 组($P<0.05$),减半联合组、联合组均低于单用药组,差异有统计学意义($P<0.05$)。其中以减半联合组、联合组抑制足垫移植瘤淋巴管生成作用较明显(Table 2)。

2.4 As₂O₃、Aspirin 单用药及联合、减半联合应用对 615 小鼠移植性前胃癌淋巴结转移的影响

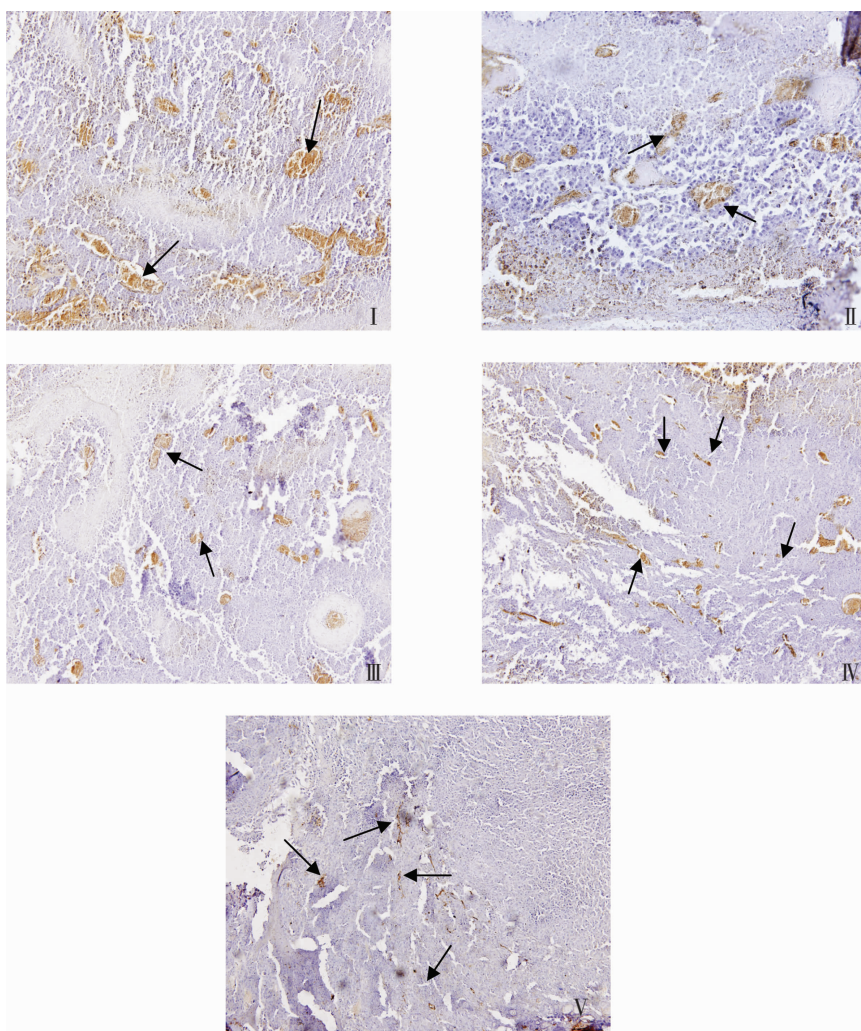
淋巴结内瘤组织学转移分级以“阳性”、“转移Ⅰ~Ⅳ级”确定为转移,“阴性”确定为未转移,各组比较可见 NS 组均出现淋巴结转移,治疗组部分小鼠淋巴结转移,以联合组转移数量最少;以 NS 组转移率最高(100%),联合组最低(50%),As₂O₃ 组与减半联合组转移率虽然相等(75%),但从淋

巴结内瘤组织学分级分析可见 As₂O₃ 组高于减半联合组;说明联合用药抑制淋巴结转移作用较 NS 组

Table 2 Calculation of LMVD in transplanted tumor in each group($\bar{x}\pm s$)

Groups	n	LMVD (Cells /HPF)
Saline group	6	9.43±2.07
Aspirin group	7	7.57±1.51*
As ₂ O ₃ group	9	5.86±1.68*
Half-dose combination group	7	3.86±1.35* [△] ▼
Combination group	8	3.29±1.11* [△] ▼

Note:One-way ANOVA, $F=18.448$, $P=0.001$; *vs Saline group $P<0.05$; [△]vs Aspirin group $P<0.05$; ▼vs As₂O₃ group $P<0.05$.



I : Saline group; II : Aspirin group; III : As₂O₃ group; IV : Half-dose combination group; V : Combination group

Figure 2 Expression of lymphatic vessel (LYVE-1) in transplanted tumor in 615 mice in each group(PV ×100)

及单用药组明显，差异具有统计学意义（ $P=0.036$ ）（Table 3, Figure 3~6）。

3 讨论

胃癌是我国常见的恶性肿瘤，浸润和转移是恶性肿瘤最本质的生物学特征。新生血管、淋巴管是肿瘤生长、浸润和转移的先决条件。因此，研究抑制

肿瘤浸润、生长和转移的方法，是研究恶性肿瘤治疗成败的关键。

溶解和穿越基底膜是肿瘤细胞侵袭和转移过程中的重要环节。基底膜的主要纤维成分是Ⅳ型胶原，肿瘤细胞及其周围的间质细胞均能产生Ⅳ型胶原酶。MMP-2 作为降解基底膜Ⅳ型胶原和细胞外基质主要结构的关键酶，与多种恶性肿瘤的侵袭转移密切相关^[7,8]。李杰茹等^[9]亦报道 MMP-2 表达与肿瘤发

Table 3 Histologic grade of lymph metastasis of footpad-transplanted tumor in 615 mice in each group

Groups	n	Histologic grade of tumor in lymph nodes*						Metastasis rate(%)	Inhibition rate(%)
		-	+	Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV		
Saline group	6	0	0	1	2	2	1	100.0	-
Aspirin group	7	0	1	2	2	1	1	100.0	-
As ₂ O ₃ group	9	2	2	2	1	2	0	77.6	22.4
Half-dose combination group	7	2	1	1	2	1	0	71.4	28.6
Combination group	8	4	2	1	1	0	0	50.0	50.0

Note: Chi-square test, *, $\chi^2=11.987$, $P=0.017$.

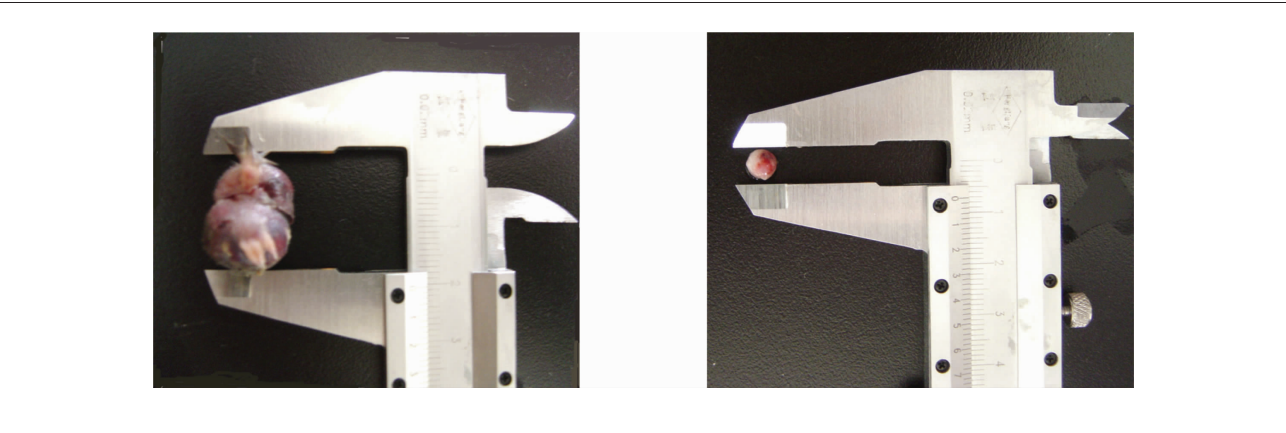


Figure 3 Footpad-inoculated tumor and metastasis of lymph node near iliac artery in saline group

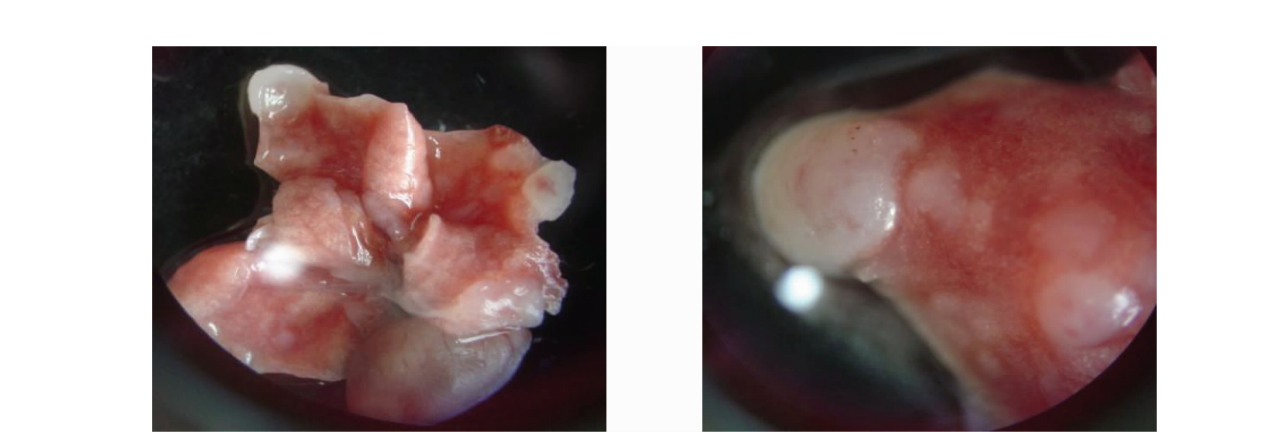
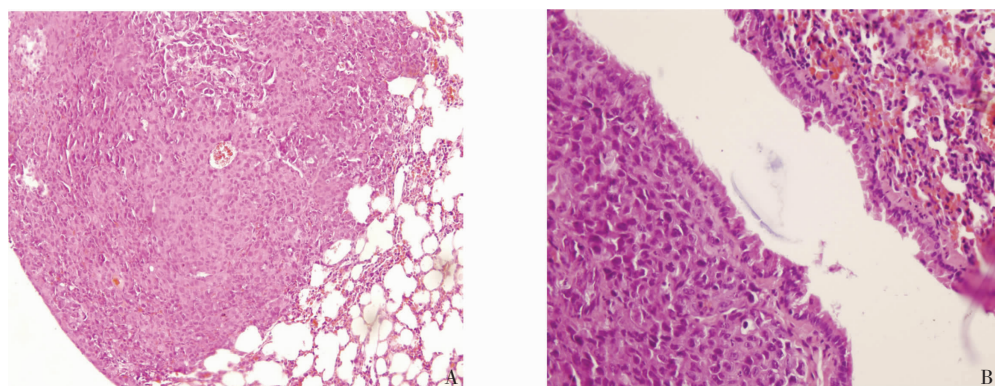


Figure 4 General observation on nodules of metastatic cancer in lung tissue in saline group



A:(HE ×100) B:(HE ×400)

Figure 5 Micro-observed metastatic cancer nests in lung tissue of MFC footpad-transplanted tumor

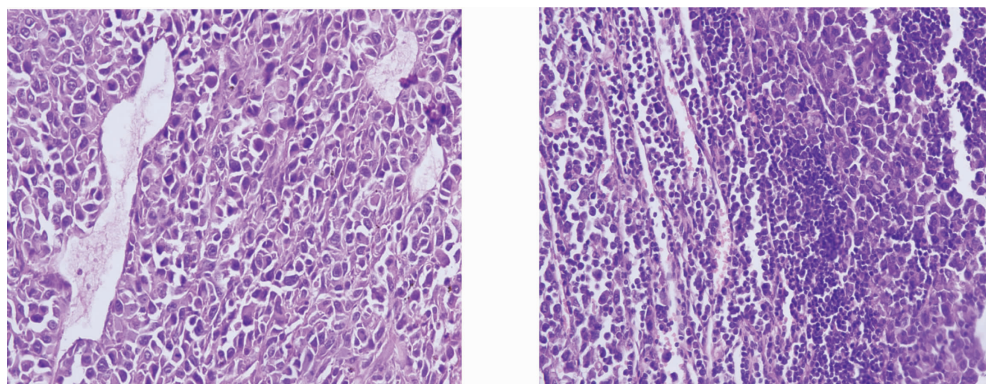


Figure 6 Micro-observed open lymph-vessel in footpad-transplanted tumor in 615 mice and their metastasis

生、发展及侵袭转移相关。我们研究结果显示 MFC 细胞足垫皮下移植后肿瘤达到Ⅲ~Ⅳ级侵袭时方出现转移,表明局部肿瘤侵袭程度与转移间具有一定关系。 As_2O_3 和 Aspirin 联合用药可以明显抑制肿瘤的侵袭,可能与 MMP-2 蛋白有关。

淋巴管生成是恶性肿瘤淋巴道转移的必要条件^[10]。近几年,随着一些淋巴管内皮的特异性物质如 LYVE-1、VEGFR-3、Podoplanin 等被陆续发现,淋巴管在肿瘤转移中的作用才得以深入研究。LYVE-1 已经广泛用于不同类型肿瘤中相关淋巴管的检测^[11-13]。肿瘤组织微淋巴管密度(lymphatic microvascular density, LMVD)最为常用,也是目前公认的反映肿瘤组织内部淋巴管情况的一个“金指标”^[14]。LMVD 通过计数单位高倍镜视野内淋巴管的数目,定量反映新生淋巴管形成的活跃程度。随着人们对肿瘤微淋巴管研究的深入,发现肿瘤组织周围的微淋巴管生成

的进程、开放状态和 LMVD 直接关系到肿瘤的生长、侵袭和转移的能力和预后,即肿瘤组织中 LMVD 越大,瘤体内部淋巴管越丰富、开放,临床预后越差。黄振步等^[15]研究认为胃癌组织中 LMVD 与有无淋巴结转移、胃癌大小、浸润深度具有明确相关性。

我们以 LYVE-1 单克隆抗体免疫标记微淋巴管内皮细胞,并进行 LMVD 计数,结果显示,在 NS 组形成开放管腔,数量较多且管腔较大,内有较多瘤细胞;各治疗组足垫移植瘤组织内新生淋巴管的数目较少且开放不完全,有的以细胞簇形式存在,未形成开放管腔结构,与 NS 组相比差别有显著性($P<0.05$),其中两药联合应用抑制足垫移植瘤淋巴管生成作用较明显。说明 As_2O_3 和 Aspirin 均能抑制移植瘤新生淋巴管形成,且联合用药可增强抗淋巴管生成作用。

我们从移植瘤淋巴结转移率的比较看,NS 组高于各治疗组,其中以联合组淋巴结转移率最低。分析

各组淋巴结转移的等级后发现, NS 组淋巴结内瘤组织学转移分级等级较高, 与各治疗组比较差异均有统计学意义。从这些比较我们可以看出, As_2O_3 联合 Aspirin 应用对肿瘤转移的抑制作用强于二者单独应用, 特别是与 Aspirin 单药应用比较; 与 As_2O_3 单药组比较, 亦有转移抑制率升高的趋势。

综上所述, 我们可以得出结论, As_2O_3 和 Aspirin 单用及联合用药均有抑制 615 小鼠足垫 MFC 移植瘤生长的趋势, 以两药联合应用作用最为明显, 但是减半联合可以降低其不良反应。且 As_2O_3 与 Aspirin 联合应用可抑制小鼠 MFC 移植瘤的生长、侵袭和淋巴道转移。然而其机制还不完全清楚, 有待我们进一步探讨。

参考文献:

- [1] Pu JH, Jiang ZY. Research of Trioxide anti-solid tumor effect and mechanism[J]. Shenzhen Traditional Chinese Medicine, 2007, 17(6): 390-392. [朴金花, 姜振宇. 三氧化二砷抗实体瘤作用及其机理的研究现状[J]. 深圳中西医结合杂志, 2007, 17(6): 390-392.]
- [2] Murashige N, Kami M, Ikeda M. Aspirin, COX-2, and the risk of colorectal cancer [J]. N Engl J Med, 2007, 357(8): 824-825.
- [3] Xu SY, Bian RL. Pharmacological experimental methods (third edition) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002. 1757-1784. [徐叔云, 卞如濂. 药理实验方法学(第三版) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 1757-1784.]
- [4] Gao J, Zhang JB. Cancer invasion and metastasis of basic and clinical [M]. Beijing: Science Press, 2003. 28-83. [高进, 章静波. 癌的侵袭与转移基础与临床 [M]. 北京: 科学出版社, 2003. 28-83.]
- [5] Gao J, Qian SS, Li BG, et al. Hematoporphyrin after laser treatment of tumor metastasis in rats[J]. Acta Academiae Medicinae Sinicae, 1985, 4: 325. [高进, 钱书森, 李宝贵, 等. 血卟啉激光治疗肿瘤后对肿瘤转移影响的实验研究 [J]. 中国医学科学院学报, 1985, 4: 325.]
- [6] Jackson DG, Prevo R, Clasper S, et al. LYVE-1, the lymphatic system and tumor lymphangiogenesis[J]. Trends Immunol, 2001, 22(6): 317-321.
- [7] Kim SH, Choi HY, Lee J, et al. Elevated activities of MMP-2 in the non-tumorous lung tissues of curatively resected stage I NSCLC patients are associated with tumor recurrence and a poor survival[J]. Surg Oncol, 2007, 95(4): 337-346.
- [8] Mrena J, Wiksten JP, Nordling S, et al. MMP-2 but not MMP-9 associated with COX-2 and survival in gastric cancer [J]. Clin Pathol, 2006, 59(6): 618-623.
- [9] Li JR, Qi FY, Li L. MMP-2 and its correlation with angiogenesis in esophageal carcinoma[J]. Chinese Journal of Oncology, 2005, 27(2): 96-98. [李杰茹, 齐凤英, 李丽. MMP-2 在食管癌中的表达及其与血管生成的相关性 [J]. 中华肿瘤杂志, 2005, 27(2): 96-98.]
- [10] Kitadai Y, Kodama M, Cho S, et al. Quantitative analysis of lymphangiogenic markers for predicting metastasis of human gastric carcinoma to lymph nodes[J]. Int J Cancer, 2005, 115(3): 388-392.
- [11] Sleeman JP, Thiele W. Tumor metastasis and the lymphatic vasculature[J]. Int J Cancer, 2009, 125(12): 2747-2756.
- [12] Beasley NJ, Prevo R, Banerji S, et al. Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer[J]. Cancer Res, 2002, 62(5): 1315-1320.
- [13] Van der Auwera, Van den Eynden GG, Colpaert CG, et al. Tumor lymphangiogenesis in inflammatory breast carcinoma: a histomorphometric study[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(21): 7637-7642.
- [14] Hansen S, Sorensen FB, Vach W, et al. Microvessel density compared with the Chalkley count in a prognostic study of angiogenesis in breast cancer patients [J]. Histopathology, 2004, 44(5): 428-436.
- [15] Huang ZB, Nie HQ. Study of the relationship between the microlymphatic vessel density and invasion and metastasis in gastric carcinoma[J]. Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2010, 26(4): 371-373. [黄振步, 聂寒秋. 胃癌组织中微淋巴管密度与侵袭转移的关系[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(4): 371-373.]