

超声诊断与治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000081

载多西紫杉醇脂质微泡联合超声靶向微泡破裂对兔 VX2 舌癌颈部淋巴转移瘤作用的初步研究

王 婷¹, 邱丽华¹, 高 志², 李 攀³, 曾 峥¹, 欧阳紫兰¹

(1. 重庆医科大学附属口腔颌面外科 口腔医院口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室, 重庆 401147;

2. 重庆医科大学附属第二医院口腔科, 重庆 400016; 3. 重庆医科大学超声影像学研究所, 重庆 400010)

【摘要】目的:初步探讨载多西紫杉醇脂质微泡(docetaxel-loaded lipid microbubbles, DLLM)联合超声靶向微泡破裂(ultrasound targeted microbubbles destruction, UTMD)对兔 VX2 舌癌颈部淋巴转移瘤的治疗作用。**方法:**成功建立兔 VX2 舌癌颈部淋巴转移瘤动物模型 30 只,随机分为 A 组、B 组、C 组、D 组、E 组、F 组($n=5$):A 组为单纯药物组、B 组为单纯载药微泡组、C 组为药物+超声组、D 组为单纯微泡+超声组、E 组为载药微泡+超声组、F 组为对照组。治疗前后用超声测量各组动物颈部淋巴转移瘤大小,计算瘤体体积和抑瘤率;比较各组动物颈部淋巴转移瘤组织中 CD34、微血管密度(microvessel density, MVD)及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达。**结果:**E 组实验动物颈部淋巴转移瘤的抑瘤率高于其他组($P<0.05$),与其他各组相比差异有统计学意义;E 组实验动物颈部淋巴转移瘤中 CD34 表达水平最低,MVD、VEGF 表达水平显著低于其他各组($P<0.01$)与其他各组相比差异有统计学意义。**结论:**DLLM 联合 UTMD 不仅能在宏观表现上抑制兔 VX2 舌癌颈部淋巴转移瘤生长,更能一定程度上从分子生物学水平明显抑制兔 VX2 舌癌颈部淋巴转移瘤的转移、生长。

【关键词】兔;颈部淋巴转移瘤;多西紫杉醇;微泡**【中图分类号】**R739.86;R445.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-12-03

作者介绍:王 婷,Email:124726111@qq.com,

研究方向:口腔颌面外科学肿瘤。

通信作者:邱丽华,Email:Gqyidi2001@163.com。

基金项目:重庆市医学科技计划资助项目(编号:2011-1-060)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000081.html

[7] Minami Y, Kudo M, Kawasaki T, et al. Percutaneous radiofrequency ablation guided by contrast-enhanced harmonic sonography with artificial pleural effusion for hepatocellular carcinoma in the hepatic dome [J]. Am J Roentgenol, 2004, 182(5): 1224-1226.

[8] Jung SE, Cho SH, Jang JH, et al. High-intensity focused ultrasound ablation in hepatic and pancreatic cancer: complications [J]. Abdom Imaging, 2011, 36(2): 185-195.

[9] Minami Y, Kudo M, Kawasaki T, et al. Percutaneous radiofrequency ablation guided by contrast-enhanced harmonic sonography with artificial pleural effusion for hepatocellular carcinoma in the hepatic dome [J]. Am J Roentgenol, 2004, 182(5): 1224-1226.

[10] Koda M, Ueki M, Maeda Y, et al. Percutaneous sonographically guided radiofrequency ablation with artificial pleural effusion for hepatocellular carcinoma located under the diaphragm [J]. Am J Roentgenol, 2004, 183(3): 583-588.

[11] Fukuno H, Tamaki K, Urata M, et al. Influence of an artificial pleural effusion technique on cardio-pulmonary function and autonomic activity [J]. J Med Invest, 2007, 54(1-2): 48-53.

[12] Ishiko T, Beppu T, Sugiyama S, et al. Local ablation therapy for hepatocellular carcinoma (HCC) on the liver surface: radio-frequency

ablation aimed at tumor marginal pre-ablation under endoscopic surgery [J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2005, 32(11): 1657-1659.

[13] Iwai S, Sakaguchi H, Fujii H, et al. Benefits of artificially induced pleural effusion and/or ascites for percutaneous radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma located on the liver surface and in the hepatic dome [J]. Hepatogastroenterology, 2012, 59(114): 546-550.

[14] 吴刚明, 闵 苏, 王智彪. 全麻下人工液胸辅助 HIFU 辐照活体羊肝对肺的影响 [J]. 泸州医学院学报, 2010, 30(3): 272-275.

[15] 吴刚明, 闵 苏. 全身麻醉下人工液胸辅助高强度聚焦超声治疗肝癌的安全性观察 [J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(2): 227-229, 233.

[16] 张卫星, 邓卫萍, 黄 耀. 呼吸控制和人工胸水在肝癌 HIFU 治疗中的应用 [J]. 中国现代医生, 2007, 45(6): 19-20, 81.

[17] 龚文婷, 魏安宁, 陈玉培, 等. 单肺通气、人工胸水辅助高强度聚焦超声治疗肝肿瘤的安全性观察 [J]. 重庆医科大学学报, 2004, 29(4): 488-490.

[18] 吴铁军, 邹秀丽, 曲爱君, 等. 胸腔积液对机械通气患者呼吸功能和血流动力学的影响 [J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(9): 556-557.

(责任编辑:唐秋姗)

Preliminary study of effect of docetaxel-loaded lipid microbubbles combined with ultrasound targeted microbubbles destruction on rabbit VX2 cervical lymph node metastatic carcinoma

Wang Ting¹, Qiu Lihua¹, Gao Zhi², Li Pan³, Zeng Zheng¹, Ouyang Zilan¹

(1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, The Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory for Oral Diseases and Biomedical Sciences; 2. Department of Stomatology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University; 3. Institute of Ultrasound Imaging, Chongqing Medical University)

[Abstract]**Objective:** To study the treatment effect of docetaxel-loaded lipid microbubbles (DLLM) combined with ultrasound targeted microbubbles destruction (UTMD) on rabbit VX2 cervical lymph node metastatic carcinoma. **Methods:** Thirty rabbit VX2 cervical lymph node metastatic carcinoma model were successfully established and were randomly divided into 6 groups (A group, B group, C group, D group, E group, F group, $n=5$). A group used docetaxel, B group used DLLM, C group used docetaxel + UTMD, D group used lipid microbubbles + UTMD, E group used DLLM + UTMD and F group was control group. Volume and inhibition rate of cervical lymph node metastatic carcinoma in each group before and after the treatment were detected and compared. Expression of CD34 and microvessel density (MVD) and vascular endothelial growth factor (VEGF) was compared among different groups. **Results:** After the treatment, inhibition rate was higher in E group than in other groups ($P<0.05$) and the expression of CD34 and MVD and VEGF was significantly lower in E group than in other groups ($P<0.01$). **Conclusions:** DLLM combined with UTMD can inhibit the growth of the cervical lymph node metastatic carcinoma from the macroscopic view. Furthermore, it can inhibit the growth of the cervical lymph node metastatic carcinoma from the molecular level.

[Key words] rabbit; the cervical lymphatic metastasis; docetaxel; microbubbles

舌癌是口腔颌面部好发率最高的恶性肿瘤^[1]。因舌部的血供十分丰富、活动性极强等原因,在舌癌早期就容易发生颈部淋巴结的转移,其预后明显受影响、并影响肿瘤的分期及临床治疗方案。因此,对于舌癌颈部淋巴转移的治疗研究显得尤其重要和迫切。目前舌癌及其颈部淋巴结转移的主要治疗方案仍是行原发灶手术扩大切除及颈部淋巴结清扫,但仍存在手术切除率低、术后复发率高、颈部严重畸形及功能严重丧失等缺点。因此,研治舌癌颈部淋巴转移瘤的有效治疗手段迫在眉睫。近年来,超声载药微泡联合超声靶向微泡破裂 (ultrasound targeted microbubbles destruction, UTMD) 技术,作为一种新的肿瘤治疗手段逐渐受到关注,越来越多的国内外研究者将其应用到乳腺癌、黑色素细胞瘤及肝癌等肿瘤治疗的研究中^[2]。本文在前期成功建立兔 VX2 舌癌颈部淋巴转移瘤模型^[3]及成功制备载多西紫杉醇脂质微泡 (docetaxel-loaded lipid microbubbles, DLLM)^[4]基础上,进行 DLLM 联合 UTMD 对兔 VX2 舌癌颈部淋巴转移瘤作用的初步研究。

1 资料与方法

1.1 实验材料

二棕榈酰磷酸酯乙醇胺、磷酸酐胆碱、磷脂酸、DAB (以

上材料购自美国 Sigma 公司);多西紫杉醇原料、多西紫杉醇注射液 (均购自西安瑞禧生物科技有限公司);全氟丙烷 (天津核工业理化工程研究所);戊巴比妥钠 (上海启晟实验器材经营部);硫酸钾 (重庆医科大学设备科);Envision 试剂盒 (达科为生物技术有限公司);兔来源 CD34、兔来源血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 抗体 (武汉博士德生物工程有限公司);VX2 肝癌组织块 (重庆医科大学生物医学工程学院惠赠);新西兰大白兔,雌雄不限,独笼喂养 (重庆医科大学动物实验中心购买及代养)。

1.2 主要仪器

CGZZ 型超声基因转染治疗仪、Philips iU22 彩色超声诊断仪 (重庆医科大学超声影像学研究所提供);倒置荧光显微镜 (Olympus CKX41);YJT-银汞胶囊调合器 (上海医疗器械股份有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 兔 VX2 舌癌颈部淋巴转移瘤模型的建立 参考欧阳紫兰等^[3]建立兔 VX2 舌癌颈部淋巴转移瘤模型。

1.3.2 DLLM 的制备 参考康娟等^[4]制备 DLLM。

1.3.3 实验动物的分组及处理 随机将 30 只动物模型分为 A、B、C、D、E、F 组,每组各 5 只动物,具体处理方法如下:A 组动物沿耳缘静脉注射含药量为 1 mg 的多西紫杉醇注射液 3 ml;B 组动物沿耳缘静脉注射含药量 1 mg 的 DLLM 3 ml;C 组动物沿耳缘静脉注射含药量为 1 mg 的多西紫杉醇注射液 3 ml 后立刻在兔颈部淋巴转移瘤表面行超声 10 s 辐照、10 s 暂停,交替持续 2 min;D 组动物沿耳缘静脉注射单纯超声微泡 3 ml 后立刻在兔颈部淋巴转移瘤表面行超声 10 s 辐照、

10 s 暂停,交替持续 2 min;E 组动物沿耳缘静脉注射含药量为 1 mg 的 DLLM 3 ml 后立刻在兔颈部淋巴转移瘤表面行超声 10 s 辐照、10 s 暂停,交替持续 2 min;F 组动物沿耳缘静脉注射生理盐水 3 ml。分别在接种后第 24、26、28 天给予以上不同方法的处理。

1.3.4 超声测量兔 VX2 舌癌颈部淋巴转移瘤大小、标本的采集和处理 分别于处理前(接种后第 23 天)和处理结束后(接种后第 29 天)24 h 通过超声观察兔 VX2 舌癌颈部淋巴转移瘤(图 1 标记处)大小并记录。最后一次处理动物 24 h 后处死动物,立即取出颈部淋巴转移瘤组织(图 2 标记处),以 4% 甲醛溶液固定进行免疫组化 CD34、VEGF 检测。

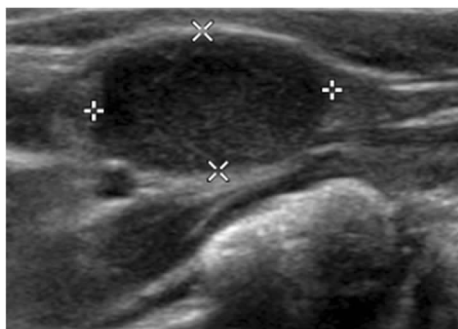


图 1 兔 VX2 颈部淋巴转移瘤超声影像

Fig.1 Ultrasonic imaging of rabbit VX2 cervical lymph node metastatic carcinoma

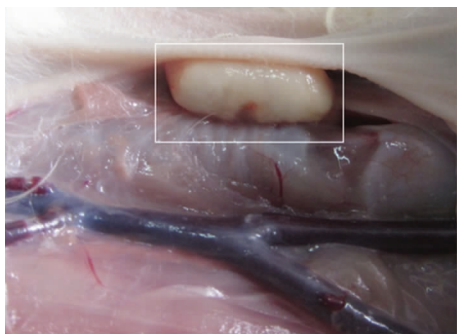


图 2 兔 VX2 颈部淋巴转移瘤解剖图像

Fig.2 Anatomical imaging of rabbit VX2 cervical lymph node metastatic carcinoma

1.3.5 免疫组化法(Envision 二步法)检测 CD34 和 VEGF 的表达 步骤:(1)消除内源性过氧化物酶的活性:石蜡切片常规脱蜡脱水等处理后用 1% H_2O_2 作用 20 min;(2)抗原修复,阻断非特异性结合位点:将切片置 0.01 mol/L、pH=6.0 的柠檬酸缓冲液中,微波 III 档作用 2 次后自然冷却至室温。室温下再置于正常山羊血清湿盒内封闭 20 min;(3)加一抗:倒去血清,擦干组织周围多余水分,分别加入 1:200 稀释的 CD34 一抗(50 μ l)后在 4 $^{\circ}$ C 条件下过夜,对照组不加一抗;(4)孵育:分别加入 Envision 试剂后,于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min;(5)显色:加入 0.04% DAB+0.03% H_2O_2 显色 8 min,于镜下控制显色程度,即时终止;(6)封片:自来水洗涤 5 min 后复染,常规树脂封片。

1.4 观察指标

1.4.1 计算并比较各组动物颈部淋巴转移瘤的体积、抑瘤率 运用超声仪器测量并记录每只兔 VX2 舌癌颈部淋巴转移瘤的最大径和最小径。根据公式:体积=(最大径 $\times$ 最小径 2)/2^[5];抑瘤率=(1-治疗组平均体积/对照组平均体积) $\times$ 100%^[6],计算并比较兔 VX2 舌癌颈部淋巴转移瘤的体积、抑瘤率。

1.4.2 观察兔 VX2 舌癌颈部淋巴转移瘤中 CD34 表达并计算其微血管密度(microvessel density,MVD) 高倍镜下观察 CD34 表达情况,同时以 CD34 作为标记,根据 Weidner^[7]评判标准,计数 MVD。

1.4.3 观察兔 VX2 舌癌颈部淋巴转移瘤中 VEGF 的表达并计算 VEGF 阳性细胞百分比 高倍镜下观察兔 VX2 舌癌颈部淋巴转移瘤中 VEGF 阳性细胞表达情况,并计算 VEGF 阳性细胞百分比。

1.5 统计学处理

本次实验结果数据录入采用 EXCEL 表,分析采用 SPSS 18.0 统计软件,实验结果均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料以率表示。整体比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 兔 VX2 舌癌颈部淋巴转移瘤的体积、抑瘤率

根据公式体积=(最大径 $\times$ 最小径 2)/2;抑瘤率=(1-治疗组平均体积/对照组平均体积) $\times$ 100%,计算结果显示:治疗前各实验动物组之间颈部淋巴转移瘤的体积相比无明显统计学意义(方差分析: $F=1.058$; $P=0.408$);治疗后各实验动物组之间颈部淋巴转移瘤体积相比有明显统计学意义(方差分析: $F=3.573$; $P=0.015$)。随着时间的延长,各组动物颈部淋巴转移瘤体积都有增大的趋势,相比之下 E 组动物颈部淋巴转移瘤体积增长趋势明显低于其他各组($P_A=0.008$; $P_B=0.027$; $P_C=0.035$; $P_D=0.005$; $P_E=0.001$),抑瘤率明显高于其他各组,与其他各组相比有统计学意义,表明 E 组动物的生长速度明显减缓,结果见表 1。

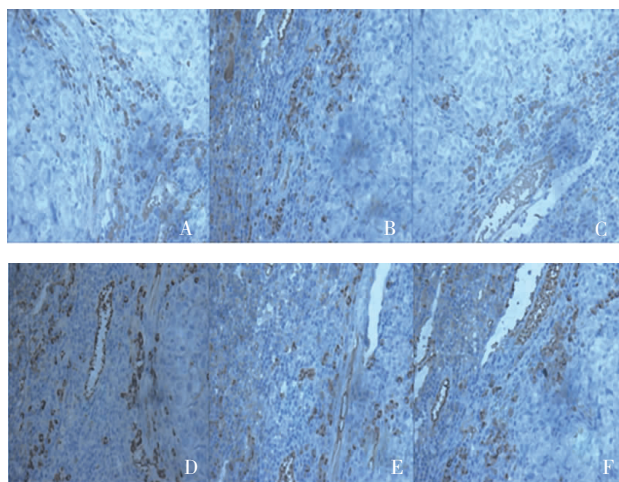
表 1 各组实验动物颈部淋巴转移瘤的体积、抑瘤率

Tab.1 Volume and inhibition rate of cervical lymph node metastatic carcinoma in each group

组别	兔 VX2 舌癌颈部淋巴转移瘤体积(mm^3)		
	治疗前	治疗后	抑瘤率(%)
A组	310.6 $\pm$ 72.8	1 072.1 $\pm$ 125.9	7.00
B组	444.1 $\pm$ 206.8	1 029.6 $\pm$ 131.5	11.11
C组	423.9 $\pm$ 112.4	1 020.4 $\pm$ 131.0	11.91
D组	497.7 $\pm$ 142.6	1 089.9 $\pm$ 139.4	5.91
E组	463.8 $\pm$ 152.6	808.9 $\pm$ 103.9	30.16
F组	372.6 $\pm$ 155.3	1 158.3 $\pm$ 148.2	0.00
F 值	1.058	3.573	
P 值	0.408	0.015	

2.2 CD34 的表达、MVD 计数

在高倍镜视野下观察各组动物颈部淋巴转移瘤中 CD34 表达,结果显示:F 组表达水平最高,E 组表达水平最低(图 3);同时以 CD34 作为标记计数 MVD 表达,各组表达情况不同(图 4),组间相比具有统计学意义(方差分析: $F=270.443$; $P=0.000$),组间两两比较差异均有统计学意义(均 $P=0.000$)。



免疫组化法检测后,在 400 倍光镜下观察 A 组、B 组、C 组、D 组、E 组、F 组动物颈部淋巴转移瘤组织中 CD34 的表达结果分别见 3A、3B、3C、3D、3E、3F 图示,其中 E 组: DLLM+US 组 CD34 表达最低; F 组: 空白组 CD34 表达最高(CD34 定位于血管内皮细胞胞浆或胞膜,显示为棕黄色、棕褐色颗粒)

图 3 光镜下各组兔 VX2 舌癌颈部淋巴转移瘤组织中 CD34 的表达

Fig.3 Expression of CD34 in rabbit VX2 cervical lymph node metastatic carcinoma under optical microscopy in each group

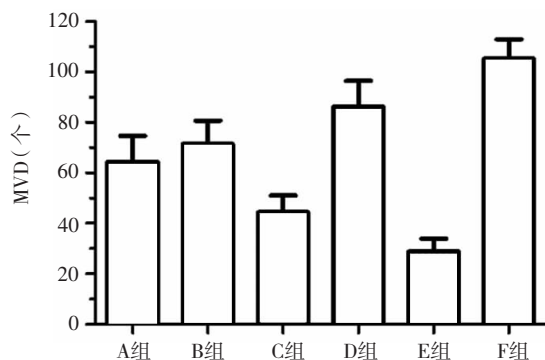
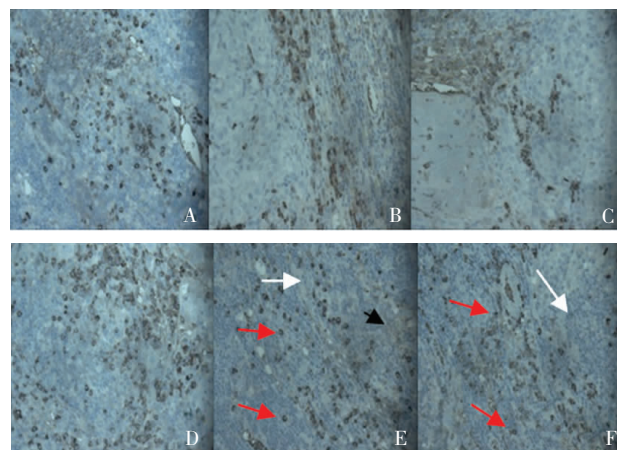


图 4 MVD 在各组动物颈部淋巴转移瘤中的计数情况

Fig.4 Expression of MVD in rabbit VX2 cervical lymph node metastatic carcinoma under optical microscopy in each group

2.3 VEGF 的表达

在高倍镜视野下计算各组动物颈部淋巴转移瘤中 VEGF 阳性细胞的百分比,结果显示:F 组表达水平最高,E 组表达水平最低(图 5);各组 VEGF 阳性细胞百分比计数不同(图 6),组间相比具有统计学意义(方差分析: $F=85.976$; $P=0.000$),组间两两比较差异均有统计学意义(均 $P=0.000$)。



免疫组化法检测后,在 400 倍光镜下观察 A 组、B 组、C 组、D 组、E 组、F 组动物颈部淋巴转移瘤组织中 VEGF 的表达结果分别见 3A、3B、3C、3D、3E、3F 图示,其中 E 组: DLLM+US 组 VEGF 表达最低; F 组: 空白组 VEGF 表达最高(其中红色箭头为阳性表达信号,白色为非特异性染色)

图 5 光镜下各组兔 VX2 舌癌颈部淋巴转移瘤组织中 VEGF 的表达

Fig.5 Expression of VEGF in rabbit VX2 cervical lymph node metastatic carcinoma under optical microscopy in each group

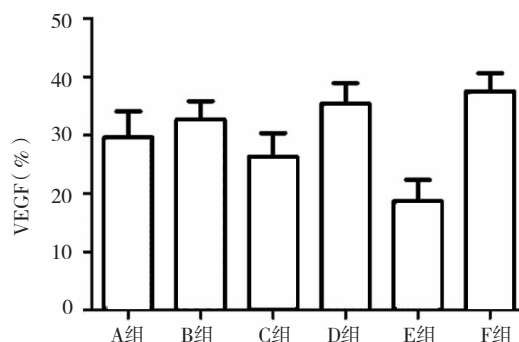


图 6 VEGF 阳性细胞百分比在各组动物颈部淋巴转移瘤中的计数情况

Fig.6 Expression of VEGF in rabbit VX2 cervical lymph node metastatic carcinoma under optical microscopy in each group

3 讨论

一直以来恶性肿瘤的治疗重点及难点都在于癌细胞强大的转移扩散功能。能否及时控制及治疗恶性肿瘤中癌细胞的转移是恶性肿瘤治疗成功与否的根本所在。近年来随着超声影像学的发展,超声微泡以其独有的优势作为一种药物、基因载体受到关注与重视,越来越多的研究者将其运用到恶性肿瘤的治疗研究中。Kang 等^[8]将 DLLM 用于肝癌原发灶的治疗,实验证明了 DLLM 联合 UTMD 可明显抑制肝癌新生血管及转移相关因子的表达。

本实验将抗肿瘤药物结合此先进技术用于兔

VX2 舌癌颈部淋巴转移瘤的治疗,不仅在宏观表现上证明 DLLM 联合 UTMD 可以明显抑制兔 VX2 舌癌颈部淋巴转移瘤的生长,而且在对各组兔 VX2 舌癌颈部淋巴转移瘤组织的免疫组化结果研究中发现 MVD、VEGF 2 项分子指标的表达上也有显著降低。推测原因可能为: DLLM 在超声靶向辐照的条件下释放多西紫杉醇,在爆破引发微泡的空化效应及组织的声孔效应等综合作用下使得血管内皮间隙增宽,细胞膜产生的一过性间隙促使药物更好的到达靶组织及其周围组织,使肿瘤细胞持续更多地凋亡,同时破坏供其生长转移的血管、淋巴管通道。事实上超声辐照载药微泡爆破时产生的空化效应本身亦可对转移瘤及其周围组织产生破坏作用,但应该作用较小。

国内外研究表明: VEGF 等促血管生成因子同时可诱导肿瘤内部及周边的淋巴管高度增生,使淋巴管的表面积及通透性增加,从而使肿瘤细胞有更多的机会接触淋巴管,促进肿瘤的转移^[9-13]。同时关于恶性肿瘤新生血管的研究中发现: 新生血管的形成不仅关系到恶性肿瘤自身的生长,更是癌细胞转移扩散的重要因素^[14-15]。新生血管一方面为恶性肿瘤组织的成长提供营养,滋养癌细胞的分化、成长促使其转移;另一方面又为新生淋巴转移管及转移瘤的形成发展提供营养保障。所以抑制或减少肿瘤新生血管相关因子的形成不仅可以成为治疗恶性肿瘤的一个靶点,同时亦可以作为恶性肿瘤相应淋巴转移瘤的治疗靶点。由此可以说明以 CD34 和 VEGF 作为分子生物学指标探索 DLLM 联合 UTMD 对兔 VX2 舌癌颈部淋巴转移瘤的作用有十分充足的意义。

载药微泡联合 UTMD 因其安全性、高效性、靶向性高、可局部定位控释性等优点,一直是研究恶性肿瘤治疗的极具潜力的方式之一。本实验结果发现将载药微泡联合 UTMD 用于恶性肿瘤淋巴转移瘤的治疗研究也十分有价值。同时采用超声靶向爆破引导药物的控释技术,往往可以使药物到达行常规恶性肿瘤淋巴清扫难以清除的淋巴微转移灶及前哨淋巴结,最大程度的控制及治疗癌细胞的转移扩散,从而达到彻底根治恶性肿瘤的目的。相信随着 UTMD 及载药微泡的多功能性的不断深入研究,将这一技术用于恶性肿瘤及颈部淋巴转移瘤的治疗将有望成为成为现实。

参 考 文 献

- [1] Dai J, Zou S, Pei Y, et al. Polyethylenimine-grafted copolymer of poly (L-lysine) and poly(ethylene glycol) for gene delivery[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(6): 1694-705.
- [2] Lentacker I, Geers B, Demeester J, et al. Design and evaluation of doxorubicin-containing microbubbles for ultrasound-triggered doxorubicin delivery: cytotoxicity and mechanisms involved[J]. *Mol Ther*, 2010, 18(1): 101-108.
- [3] 欧阳紫兰, 邱丽华, 王 婷, 等. 建立兔舌癌颈淋巴结转移模型的多普勒超声动态监测[J]. *重庆医科大学学报*, 2013, 38(9): 1002-1005.
- [4] 康 娟, 刘 瑶, 吴小翎, 等. 载多西紫杉醇脂质微泡超声造影剂的制备及其性质[J]. *中华超声影像学杂志*, 2008, 17(8): 724-727.
- [5] Zhang DY, Shen XZ, Wang JY, et al. Preparation of chitosan-polyaspartic acid-5-fluorouracil nanoparticles and its anti-carcinoma effect on tumor growth in nude mice[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(22): 3554-3562.
- [6] Okuno S, Harada M, Yano T, et al. Complete regression of xenografted Human carcinomas by camptothecin analogue-carboxymethyl dextran conjugate(T-0128)[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(11): 2988-2995.
- [7] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1995, 36(2): 169-180.
- [8] Kang J, Wu X, Wang Z, et al. Antitumor effect of docetaxel-loaded lipid microbubbles combined with ultrasound-targeted microbubble activation on VX2 rabbit liver tumor[J]. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 2010, 29(1): 61-70.
- [9] Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications[J]. *N Engl J Med*, 1971, 285(21): 1182-1186.
- [10] Bouck N, Stellmach V, Hsu SC. How tumors become angiogenic[J]. *Adv Cancer Res*, 1996, 69: 135-174.
- [11] Muller A, Homey B, Soto H, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis[J]. *Nature*, 2001, 410(6824): 50-56.
- [12] Kriehuber E, Breiteneder-Geleff S, Groeger M. Isolation and characterization of dermallymphatic and blood endothelial cells reveal stable and functionally specialized cell lineages[J]. *J Exp Med*, 2001, 194(6): 797-808.
- [13] Stacker SA, Williams RA, Achen MG. Lymphangiogenic growth factors as markers of tumor metastasis[J]. *APMIS*, 2004, 112(7-8): 539-549.
- [14] Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, et al. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(5): 1786-1790.
- [15] Furudoi A, Tanaka S, Haruma K, et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor C expression and angiogenesis at the deepest invasive site of advanced colorectal carcinoma[J]. *Oncology*, 2002, 62(2): 157-166.

(责任编辑: 关蕴良)