

人肝癌移植裸鼠后基膜成分分布的变化*

欧阳能太 周慕珩 董 郡

(病理学教研室)

提 要 15例人肝癌手术标本移植裸鼠后, 3例获成功。作者对移植前后的肝癌组织进行了石蜡切片的Ⅳ型胶原(CollⅣ)、层粘连蛋白(LAM)和纤维连接蛋白(FN)的免疫组化染色。结果显示: ①人肝癌移植裸鼠后, 癌组织形态结构基本保持不变, 但基膜成分的分布变得不规则, 量减少。②原肝癌与周围肝组织交界处未发现连续性的基膜成分阳性染色, 而移植瘤与宿主组织交界处可见连续性的基膜成分分布。③肝癌裸鼠移植瘤中细胞周围 CollⅣ和 FN 阳性, 提示肝癌组织中部分 CollⅣ和 FN 可能是由肝癌细胞产生。

关键词 肝癌; 基膜成分; 裸鼠; 免疫组织化学

中图分类号 R73-354

有关高转移的肿瘤裸鼠模型的建立文献已有不少的报道, 移植瘤多数呈膨胀性生长, 较少向周围浸润和转移。多认为可能与裸鼠的天然杀伤细胞(NK细胞)活性较高, 移植瘤细胞浸润特性的改变以及移植瘤周围形成包膜等因素有关^[1-4]。近年来, 基膜成分在肿瘤浸润中的作用越来越受到重视。关于裸鼠移植瘤浸润性改变与基膜成分分布改变的关系, 文献尚少报道。作者通过外科手术切除肝癌, 将标本移植于裸鼠, 对移植前后的肿瘤组织进行Ⅳ型胶原(collagen typeⅣ, CollⅣ)、层粘连蛋白(laminin, LAM)和纤维连接蛋白(fibronectin, FN)等基膜成分的免疫组织化学方面的研究, 对移植瘤周围包膜的基膜成分的特性、来源以及与肿瘤浸润之关系等作了初步的探讨。

材 料 与 方 法

材料及来源

1. 肝癌标本 15例肝癌手术切除标本取自本校附属肿瘤医院手术室。除1例为胆管细胞癌外, 其余均为肝细胞癌。

2. 动物 nc-nu/nu裸小鼠为本校裸鼠实验室繁殖。雌雄兼用。鼠龄4~6周。饲养于无特殊致病菌(SPF)环境下。

3. 试剂 本实验免疫组织化学材料是使用Vectastin公司的ABC药盒。显示剂二氨基联苯胺(DAB)为Aldrich公司生产。所用抗体的来源及用法详见表1。

表1 3种第一抗体的来源及用法

第一抗体	品 种	来 源	稀 释 度	特 异 性
FN	多克隆	DAKO A245	1:400	基膜(结缔组织)
LAM	多克隆	GIBCO 680-3310	1:500	基膜
CollⅣ	单克隆	SEROTEC McA119	1:1200	基膜(结缔组织)

方 法

1. 肝癌裸鼠移植 新鲜肝癌手术切除标

小时取出肿瘤传代。方法同上。并进行裸鼠的本在无菌条件下经1640液冲洗, 剪成1~2mm³小块后, 取4~5块经套管针种入裸鼠腋部皮下。移植瘤成活者, 在肿瘤长至10mm³大

*高校博士点科研基金资助课题, 第一作者现在江西宜春医学专科学校病理教研室

常规解剖检查。

2. 免疫组织化学染色 肝癌组织经10%中性福尔马林固定液固定16~24小时。常规脱水,石蜡包埋,切片厚为4 μ m,涂胶贴片,58℃烤3~5小时。经二甲苯、酒精脱蜡后进行Coll IV, LAM和FN的免疫组化ABC法染色和常规HE染色。免疫组化染色基本步骤:①3% H_2O_2 液浸泡5分钟,以消除内源性过氧化氢酶,蒸馏水洗10分钟;②胰蛋白酶液消化25分钟,磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)洗3次各5分钟;③正常羊(或马)血清孵育15分钟;④第一抗体孵育1小时(室温),PBS洗3次各5分钟;⑤羊抗兔(或马抗鼠)血清1:200孵育60分钟(室温),PBS洗3次各5分钟;⑥ABC1:100孵育60分钟,PBS洗3次各5分钟;⑦DAB显色(DAB的配制:3mg DAB加入5ml PBS中,溶解后过滤),临用前加入3% H_2O_2 25 μ l,显微镜下显色,流水冲洗;⑧苏木素复染15~30秒,流水冲洗20分钟;⑨酒精脱水,中性树胶封片。

观察

1. 裸鼠移植瘤的观察 肿瘤移植裸鼠后,每周肉眼观测1次,大小以几何平均直径(GMD)表示($GMD = \sqrt[3]{(L \times W \times H)}$)。移植瘤长至10mm大小时,处死裸鼠并解剖,肉眼观察移植瘤的大体生长情况。

2. 肝癌的组织学分型 参照1978年WHO的肝癌分类标准。肝癌的分级参照武汉医学院和中山医学院合编的《外科病理学》。

3. 基膜成分在肝癌组织中的分布类型 参照Donato和Jagirdar等^[5,6]方法分为细胞周型、小梁周或腺泡周型、间质型和瘤周型。染色评价采用半定量方法:(-)表示无阳性染色;(+)表示稀疏分布或弱染色;(++)表示中等量分布;(+++)表示密集分布。同时观察阳性染色的连续性。

结 果

人肝癌移植裸鼠前后的形态特征

15例人肝癌移植裸鼠后,有3例移植成

功,并分别传3~5代,即病例HT-3、HT-6以及HT-11。3例成活的第2代移植瘤,即HT-3 I、HT-6 I和HT-11 I,组织形态上仍能保持原肝癌的基本特征。但在癌细胞排列上,HT-3 I和HT-11 I的原肿瘤均以梁索状结构为主,而移植瘤中梁索状结构不明显,癌细胞呈巢状紧密排列。血窦样结构形成较少。3例移植瘤肉眼均未见明显浸润,有薄层包膜环绕。但在人体内的原肝癌均呈浸润性生长。移植瘤的分化程度均与原肿瘤保持一致(表2)。

表2 3例人肝癌移植裸鼠前后的形态特征

病例号	移植前后	分化程度	组织类型*
HT-3	前	Ⅱ	梁索型(部分实体性)
	后	Ⅱ	实体型(部分梁索状)
HT-6	前	Ⅰ	腺泡型(部分梁索状)
	后	Ⅰ	腺泡型(部分梁索状)
HT-11	前	Ⅱ	梁索型(部分透明细胞,部分实体性)
	后	Ⅱ	实体型(部分梁索状)

* 括号里为次要的结构类型

人肝癌裸鼠移植前后基膜成分的分布

1. FN的分布 本实验的3例肝癌裸鼠移植瘤, FN的分布与原肿瘤有所不同,具有以下特点:①原肝癌与周围肝组织交界处无明显的连续性FN染色分隔,癌细胞呈浸润性生长。而移植瘤与宿主组织交界处FN染色明显阳性,形成一连续的线状或网格状分布包绕移植瘤,形成清楚的分界;②原肝癌的小梁周围FN呈连续性线状分布。而在移植瘤中仅见少量非连续、不规则呈散在的小条状分布;③移植前后的肝癌中均可见细胞周围FN和间质FN的阳性染色反应。另外,较特殊的是在HT-11 I移植瘤中,可见肿瘤与宿主组织交界处FN染色出现局灶性缺损(图1)。在该处外又形成一癌细胞灶,其周亦由FN染色阳性的包膜所环绕。

2. LAM的分布 LAM在移植瘤中的分布与原肿瘤有差别:①与FN染色相似, LAM在移植瘤周围亦呈一连续性线状或网格状的分布

(图2)。而原肿瘤与周围组织交界处无连续性的LAM分布(图3)。②原肝癌的小梁周LAM呈连续或不连续的线状分布。而移植瘤中却未见有连续性分布的小梁周LAM,仅见少量散在不规则的小条状LAM阳性染色。在移植瘤与宿主组织交界处亦可见连续性的LAM染色局灶性缺损,癌细胞向外生长的现象,其外面的包膜LAM染色亦呈阳性(图4)。移植前后的肝癌中均未见到细胞周LAM阳性。

3. Coll IV的分布 抗人Coll IV单克隆抗

体染色,在原肿瘤中,肝癌组织与周围肝组织交界处亦未见有连续性的Coll IV分布。小梁周的Coll IV则呈连续性或不连续的带状分布。而在移植瘤中,上述FN和LAM染色阳性的癌组织与宿主组织交界处未见连续性的Coll IV染色阳性。仅在局部见少量散在Coll IV分布。小梁周Coll IV则呈不规则的小条状,分布于癌细胞梁索之间。较突出的是在3例移植瘤中均可见部分癌细胞周Coll IV染色阳性。而在原肝癌中均未见到此现象。3例肝癌裸鼠移植前后3种基膜成分的分布详见表3。

表3 3例人肝癌裸鼠移植前后基膜成分的分布

病例号	移植	FN					LAM			Coll IV			
		瘤周	小梁周	细胞周	间质	瘤周	小梁周	细胞周	间质	瘤周	小梁周	细胞周	间质
HT-3	前	+i	++	+	+	+i	++	-	-	+i	++	-	±
	后	+++c	+	+	+	++c	+	-	-	-	+	+	+
HT-6	前	+i	++	+	+	*	*	*	*	*	*	*	*
	后	++c	++	+	+	++c	+	-	±	-	+	+	+
HT-11	前	+i	++	+	+	+i	++	-	-	+i	++	-	+
	后	+++c	+	+	+	+++c	+	-	-	+i	+	+	±

c: continued i: interrupt * 染色效果不佳,未作分析

讨 论

人肝癌裸鼠移植前后基膜变化与生物学特性的关系

一般认为,肿瘤移植于裸鼠后,能保持原肿瘤的组织学及其生物学特性,但移植瘤通常不易发生浸润和转移。本文3例裸鼠移植成功的人肝癌经多次传代均未见有转移现象。这与汤钊猷等^[7]报道的结果一致。有人认为这可能与裸鼠的NK细胞活性较强有关。但Fiennes等^[2]采用T细胞和NK细胞联合缺陷的 beige-nude 小鼠实验,在70只皮下移植瘤中仅有3例发生转移。目前多数学者认为NK细胞不是决定浸润转移的主要因素。

Sharkey 等^[8]提出移植瘤周围形成的纤维结缔组织假包膜可能限制了移植瘤向周围浸润。但生长在人体的肿瘤,宿主的结缔组织增生反应所形成的假包膜较移植瘤的厚得多,却

不能限制肿瘤的浸润。裸鼠移植瘤周菲薄的假包膜是否其特性与一般的结缔组织包膜有所不同,目前尚未见文献报道。本实验结果显示,全部肝癌移植瘤边界清楚。经免疫组化证实,移植瘤周假包膜含有丰富的FN和LAM等基膜成分,形成连续性线状或网格状排列,而它们的原发肿瘤的假包膜则未见上述基膜成分的明显阳性染色。由于基膜是由一些大分子物质组成的一种复杂的致密结构。原位癌亦必须穿过基膜这一主要屏障而成为浸润癌。故我们推测,恶性肿瘤移植裸鼠后浸润性改变可能与移植瘤周所形成的假包膜含有丰富的基膜成分有关。

有人^[6]认为人类恶性肿瘤在裸鼠身上多次传代后,肿瘤细胞本身的浸润能力可能发生了改变。但经裸鼠多次传代的肿瘤细胞,重新进行细胞培养时,其浸润能力并未见明显的改变。本实验结果中仍可见到肝癌移植瘤细胞的

局灶浸润现象,说明裸鼠肝癌移植瘤细胞仍具有浸润生长的能力。但其浸润性生长似乎因基膜成分的形成包绕而受到限制。当癌细胞突破了假包膜向外浸润时,宿主又可不断地对浸润的癌细胞产生富含基膜成分的假包膜将其包绕。宿主对癌细胞的这一反应性增生是否会因癌细胞与宿主的异种差异而不同,有待进一步的研究。

尽管移植瘤与原肿瘤的形态结构基本保持不变。但基膜成分的分布却有明显的不同。在移植瘤中,基膜成分的量明显减少,呈不规则的小条状分布。其原因可能与下列因素有关:①肿瘤细胞因生长环境的改变,产生基膜成分的特性亦有所改变。②肿瘤的间质细胞繁殖不如肿瘤细胞,故由间质细胞产生的基膜成分减少。③宿主产生的部分基膜成分在移植瘤中呈不规则的分布。总之,由于肿瘤中的基膜成分来源尚不十分清楚,移植瘤中影响基膜成分分布改变的因素尚需进一步探讨。

关于肝癌组织中基膜成分的来源

对肝癌组织中基膜成分的来源目前还不是很清楚。尽管肝癌细胞产生Coll IV和FN的能力已在细胞培养中被证实^[9,10]。但肝癌细胞在体内产生Coll IV尚无文献报道。本实验的抗人Coll IV单克隆抗体染色清楚地显示肝癌移植瘤组织中含有丰富的Coll IV。并见有肝癌细胞周Coll IV染色阳性。这证明肝癌细胞在体内能产生Coll IV。移植瘤周包膜中的Coll IV染色呈阴性反应,即瘤周包膜中的Coll IV可能是鼠源性的。包膜中的FN和LAM成分是否为鼠源性的,尚待用其单克隆抗体染色进行鉴别。与Donato等^[5]观察到的结果相似,本文大多数肝癌组织中均见细胞周FN阳性,但未见有癌细胞周LAM的阳性染色。因此,

我们认为肝癌组织中至少部分Coll IV和FN是肝癌细胞产生的。窦状隙间质细胞可能是肝癌组织中LAM的主要来源。

(本文图见插页2)

参 考 文 献

1. 薛克勋,等. 人肺腺癌移植于裸小鼠不同部位侵袭能力的观察. 中国医学科学院学报 1986;8(2):128
2. 黄强,等. 人瘤移植于裸小鼠的实验研究. 江苏医药 1987;9(4):499
3. 吴秉铨,等. 人肠粘膜腺癌的裸鼠移植瘤及其生物学特性的研究. 北京医学院学报 1986;8(2):128
4. Herberman RB, et al. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. Int J Cancer 1975;16(2):216
5. Donato MF, et al. Distribution of basement membrane components in human hepatocellular carcinoma. Cancer 1989;63(2):272
6. Jagirdar J, et al. Fibronectin patterns in hepatocellular carcinoma and its clinical significance. Cancer 1985;56(9):1643
7. 汤钊猷,等. 裸鼠人体肝癌组织模型的建立与应用. 肿瘤 1986;6(1):10
8. Sharkey FE, et al. Metastasis of human tumor in athymic nude mice. Cancer 1979;24(5):733
9. Yamada KM, et al. Cell surface interactions with extracellular materials. Ann Rev Biochem 1983;52:761
10. Uchion R, et al. Biosynthesis of various types of collagen by human hepatocellular carcinoma cells [in vitro]. Virchows Arch [B] 1985;48(3):229

(1991-06-30收稿 1991-10-29修回)

DISTRIBUTION OF BASEMENT MEMBRANE COMPONENT IN HUMAN HEPATOCELLULAR CARCINOMA AND ITS XENOGRAFT IN NUDE MICE

Ouyang Nengtai Zhou Muheng Dong Jun
(Department of Pathology)

Authors described the immunohistochemical localization for components of the basement membrane (BM), fibronectin (FN), collagen type IV (Coll IV) and laminin (LAM), in 15 hepatocellular carcinoma (HCC) and 3 human HCC xenografts in nude mice. The results indicated that: 1. The above-mentioned BM components became irregularly distributed and their quantity was decreased in the human HCC xenografts of nude mice, but the morphological structure of the carcinoma was not changed. 2. There was a continuous BM components capsule, surrounding the xenografts of nude mice, while it could not be seen in the human HCC. This might be responsible for the failed invasion of the xenografts. 3. The pericellular staining for FN and Coll IV were found in the HCC xenografts of nude mice. This suggests that the FN and Coll IV might be synthesized, at least in part by hepatocellular carcinoma cells.

Key words hepatocellular carcinoma; basement membrane component; nude mice; immunohistochemistry

简 讯

从1992年起,学报将定期召开有全体常务编委参加的定稿会,以进一步对学报论著的创造性、科学性、实用性作严格把关,从而加强编委会对学报质量的宏观控制。这一决定是在1991年10月18日的1992年首期定稿会上做出的。

21位与会者,包括上届常务编委11名,编委和有关专家代表6名,学报专职工作人员4名,在听取学报编辑室负责人作1989年以来的工作总结后,大家就学报今后的工作方针、工作程序以及对学报目前面临困难的解决办法提出了建议,确定了审稿-定稿-编稿-发稿的工作制度。会上还完成了编委会的换届工作,有71名专家被提议组成新一届学报编委会,其中顾问9人、常务编委16人(见封4)。

会议由编委会主任彭文伟教授主持。校党委副书记卓大宏教授、期刊编辑部主任祝家镇教授等参加了会议。彭文伟教授在会上做重点发言时指出:学报是科委确定的一级杂志,是我校的学术橱窗,中山医大的学术声誉、学术地位维系于学报一身,因此要在人力、物力和财力上给学报予特殊的倾斜政策,要给学报予不同于其它刊物的待遇,一定要下决心、花气力扶持它,办好它。

(学 讯)