

癌细胞侵袭和转移的实验研究及其侵袭过程形态学模式和转移模型的建立

高 进

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京)

摘 要

本文利用不同动物瘤株和人类癌细胞系, 在体外和体内研究中发现癌细胞侵袭过程具有相似规律, 从而提出侵袭过程分为五个阶段的模式。并指出在侵袭过程中癌细胞伸出的丝状伪足起着重要作用。为了癌细胞转移机制的研究, 利用国内自建的动物瘤株, 相继建立了一个高肺转移和两个高淋巴合并肺双向转移的模型, 并将其中两个模型又建成长期传代的细胞系 (MFC 和 MUCC)。这些模型和细胞系对今后转移机制研究极为有用, 并对淋巴道转移步骤、血道转移部位及其来源之间的关系做了较详细研究, 在文内进行了讨论也提出了一些初步看法和观点。

肿瘤侵袭和转移是恶性肿瘤最重要的生物学特征。临床上患恶性肿瘤的病人, 往往不是由于原发瘤而致死, 他们以 80—90% 死于侵袭和转移。侵袭是瘤细胞向邻近组织侵袭到破坏的局部扩散过程; 而转移是从原发瘤部位运行到远距离的器官和组织发展为转移瘤灶 (继发瘤)^[1]。一般来说, 侵袭和转移是联系在一起的, 正像俗语所说的“车和马”的关系, 有的学者认为^[2] 侵袭一定会引起转移, 转移一定会有侵袭, 但是基底细胞癌则常常例外。Marcel^[3] 认为转移也是侵袭的肿瘤 (继发瘤)。Hart^[2] 认为侵袭和转移是恶性表达不可分离的组成部分。但侵袭和转移是一个发展过程的两个阶段, 其两者关系和发展机制, 至今仍不十分清楚。因此, 近来对侵袭和转移已引起了人们极大的注意。侵袭和转移机制的研究是今后根治恶性肿瘤至关重要的课题, 我组自 1979 年开始进行了这两个专题的研究, 现报道如下。

一、瘤细胞侵袭性实验研究和侵袭过程形态学模式的建立

1. 材料和方法

为了瘤细胞侵袭的研究, 利用体外器官培养、扩散小室 (diffusion chamber) 和体内移植, 包括瘤细胞将移植到同系小鼠和裸鼠体内等方法, 观察瘤细胞侵袭过程的形态学特征。利用的瘤细胞有: 小鼠肝癌腹水瘤细胞 (H₂₂), 小鼠网织细胞肉瘤腹水型瘤细胞 (L₁₁)^[4], 人的鼻咽癌细胞系 (CNE)^[5, 6], 人肝癌细胞系 (BEL-7402)^[6] 及食管癌细胞系 (ECA-109)^[7], 作为器官培养的侵袭细胞, 此外还利用人食管癌细胞系 (ECA-109) 和可移植性小鼠子宫颈癌 27

号 (U₂) 移植于裸鼠^[9] 和小鼠^[10] 的不同部位, 进行对比研究。以小鼠胚胎心、肾的小块, 成年鼠子宫和鸡胚心脏作为器官培养的基质(靶组织)、鼠类的肌肉组织作为体内靶器官。

在瘤细胞侵袭过程以光学显微镜、透射电子显微镜、扫描电子显微镜和冷冻断裂技术去观察其形态学特征。

2. 结果和讨论

通过不同瘤细胞, 包括人类瘤细胞和动物瘤细胞, 在器官培养中^[4-6,11] 和扩散盒的培养(也称体内器官培养)^[8] 所得结果基本相似。瘤细胞在体外侵袭过程分为 5 个阶段(图 1)。(1) 瘤细胞向器官表面靠拢;(2) 瘤细胞用丝状伪足紧贴于器官表面(图 2);(3) 瘤细胞伸出伪足沿细胞自然间隙穿过基底膜开始向器官内侵入;(4) 瘤细胞进一步侵入器官深部;(5) 在器官深部形成癌巢。在侵袭过程瘤细胞从边缘伸出丝状伪足, 后者在侵袭开始阶段起主要作用, 丝状伪足可能有 4 个主要作用:(1) 运动作用;(2) 粘连作用, 后者已被许多作者所证实^[12,13];(3) 吸收营养和吞噬作用;(4) 支持作用(图 2)。关于瘤细胞丝状伪足在侵袭过程所起作用的观察, 特别是如此比较详细的观察^[9], 在此之前尚未查见如此详细的报道。

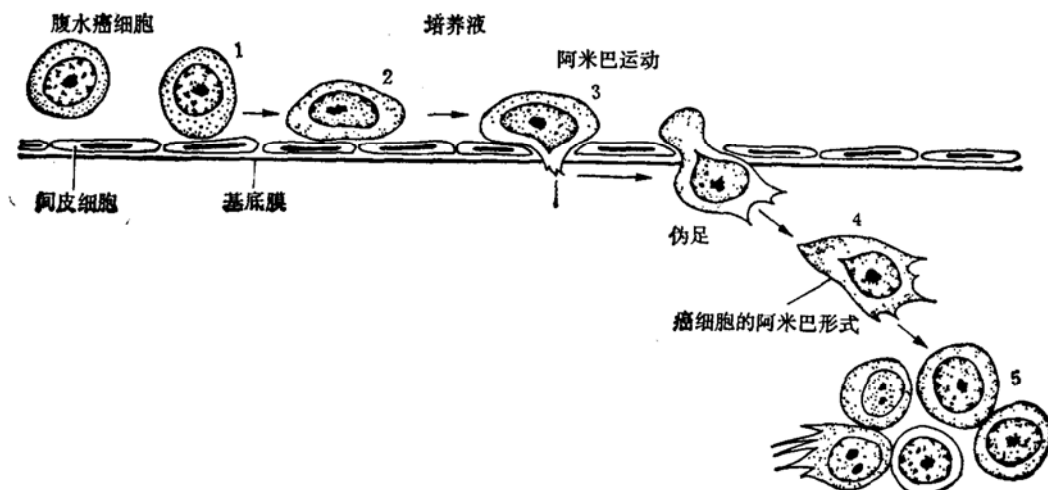


图 1 在器官培养中癌细胞侵袭的形态特性

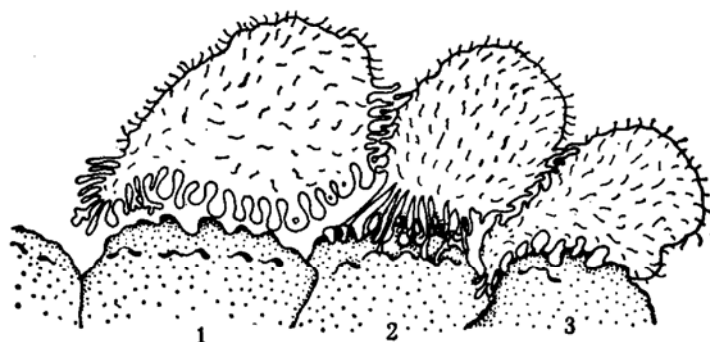


图 2 人类鼻咽癌细胞系侵袭培养器官过程的图解

为了对比研究, 将瘤细胞(包括动物瘤细胞^[10] 和人的癌细胞^[7,9])移植于动物体内, 以肌肉组织为靶器官, 用光学显微镜和电子显微镜观察其侵袭过程形态特征。结果发现瘤细胞在体



图 3 瘤细胞侵袭肌肉组织的方式和过程图解

内侵袭过程的第 1, 2, 3 阶段(图 3)和体外观察结果^[4,5]基本相似,但也查见瘤细胞直接侵入肌细胞内现象^[7,9](图 3)。另外在体内侵袭第 4 阶段中可见瘤细胞形成癌巢后,被肌肉组织所包绕;当瘤细胞继续增殖后,可冲破肌肉包围,致使肌肉组织萎缩和消失,后者为第 5 阶段(图 3)。以上现象可能由于瘤细胞迅速增殖,吸收了周围组织的营养或瘤细胞直接侵犯肌细胞而导致肌细胞营养不良、变性、萎缩,最后由瘤细胞取代肌组织^[10]。另外在体内的第 4, 5 阶段在体外培养中是见不到的,原因是器官培养中器官只需要存活,不需要其增殖(有时需要进行射线、照射处理)。因此关于宿主组织与瘤细胞相互作用的关系,仅在体内研究中查见。

二、癌细胞血道和淋巴道转移的实验研究和转移模型的建立

1. 材料和方法

(1) **实验性转移模型的建立** 利用艾氏腹水瘤细胞给小鼠后肢脚掌内侧皮下接种:以 Walker 256 癌肉瘤的细胞悬液给大鼠后肢脚掌皮下或皮内接种,在不同时期处理动物观察瘤细胞淋巴道转移的规律^[14,15]。

(2) **自发转移模型的建立** 利用小鼠子宫颈癌 14 号 (U_{14})^[16],子宫颈癌 27 号 (U_{27})^[17]和小鼠前胃癌 (FC)^[18] 实体瘤或腹水瘤,给小鼠皮下或肌肉内移植后观察自发转移发生的规律。

(3) **自发转移瘤株细胞系的建立** 将保种传代的小鼠子宫颈癌 27 号^[19]和前胃癌 (FC)^[20]瘤株的实体瘤取出,在无菌条件下选出新鲜瘤组织,切成 $0.5-1.0\text{mm}^3$ 小块,在培养瓶内进行原代培养,将长好的单层细胞进行传代。将传 20 代以后的培养细胞进行生长曲线、分裂指数、染色体分析及致瘤率和转移率的观察。

2. 结果和讨论

(1) 利用动物后肢脚掌内侧皮内或皮下接种瘤细胞的方法,已成功地建成了二个实验性转移模型。即小鼠艾氏腹水瘤实验性转移模型^[14,21],转移率 40 d 时为 20%,瘤细胞在接种后 30 min 内到达腠窝淋巴结,3h 到达髂动脉旁淋巴结^[14];第二个是大鼠 Walker 256 癌肉瘤实验性转移模型,淋巴转移率为 59.5%^[15],并观察到^[14,15,21]瘤细胞进入毛细淋巴管后,随输入淋巴管进入淋巴结边缘窦,再侵袭到中间窦、髓窦,最后形成全淋巴结转移灶,或由输出淋巴管发生再转移(图 4)。以上模型对瘤细胞淋巴道转移过程、转移机制及转移和宿主的关系等方面探讨是很有意义的。

(2) **建立了 3 个自发转移模型** 1) 自发淋巴转移合并血道双向转移模型有 2 个,其中之一是小鼠子宫颈癌 14 号 (U_{14})^[16] 其淋巴转移率为 95%(19/20),肺转移为 80%(16/20),移植后 15d 首先出现淋巴转移,25d 后出现肺转移。肺转移灶为弥散型分布,另一个是小鼠子宫

颈癌 27 号 (U_{27}) 分为两组进行, ① 肌肉内移植后, 淋巴结转移为 100% (24/24); 肺转移为 95.8% (23/24); ② 皮下移植后淋巴转移为 90.5% (19/21), 而肺转移为 66.6% (14/21)^[17]. 以上两个动物模型国内尚未见报道, 凌茂英等^[22]曾报道单纯淋巴道高转移模型 (小鼠肝癌 (H_{22}) 淋巴道转移模型). U_{14} 和 U_{27} 两个都具有双向转移, 这将对研究淋巴转移与血道之间关系是个很有价值的模型. 2) 第三个是小鼠前胃癌 (FC) 血道转移模型^[16], 转移灶仅出现于肺. 实验用第 113, 119 和 124 代瘤株进行了转移率研究的实验. 结果是 113 代瘤株转移率为 74% (29/39) 119 代发生转移为 86.6% (26/30), 而 124 代瘤株转移率为 90% (27/30). 该瘤株也属高血道转移瘤, 其转移率随着传代代数的增加, 转移率也逐渐提高. 由于该模型转移率尚不到 100%, 因此后者对于研究促进或抑制转移因素的探讨是很理想的模型. 国内虽有小鼠肺腺癌 (LA-795) 具有 100% 肺转移^[23]模型的报道, 但小鼠前胃癌 (FC) 血道转移模型尚属国内首次报道.

(3) 两株具有自发转移瘤株细胞系的建立 1) 具有血道自发转移的小鼠前胃癌 (FC) 的细胞系的建立, 称为 MFC^[20], 已传代 130 代以上, 该细胞系贴壁生长, 失去接触抑制, 具有恶性特征的多形性的上皮样细胞, 电子显微镜下可见到张力微丝和桥粒. 细胞群体倍增时间为 24.7h; 最高细胞分裂指数达 62%, 染色体众数为 70—76. 同基因动物皮下移植, 生瘤率为 100%, 其组织学结构与原培养材料相同, 并有 81.8% 肺转移^[20]. 表明该细胞系是小鼠前胃癌 FC 的细胞系. 本细胞系是研究肿瘤异质性和亚群分离较理想的细胞系. Fidler 等^[24, 25]曾用肿瘤细胞体外克隆方法, 证明 B_{16} 黑色素瘤是由不同转移能力的细胞亚群组成的. 本细胞系非常适于分离不同转移力细胞亚群, 其不同转移能力亚群正在分离中.

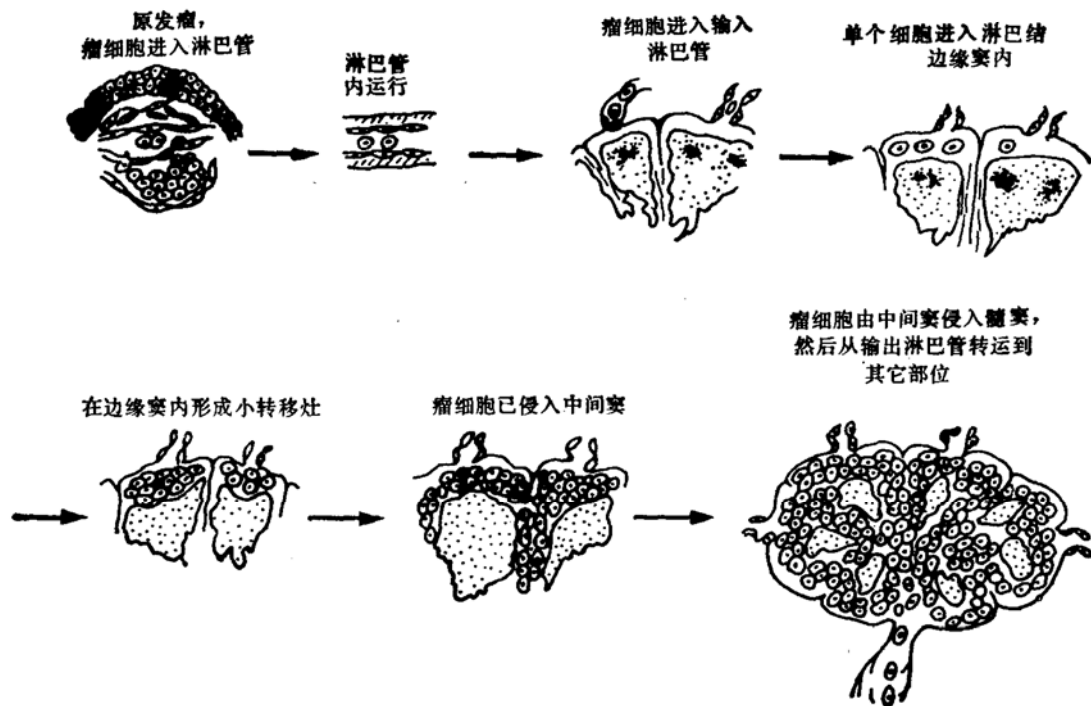


图 4 淋巴道转移 7 个步骤图解

2) 具有淋巴和血行双向转移特性的小鼠子宫颈癌 (U_x) 的细胞系建立,称为 MUCC, 目前已传 100 代以上, MUCC 细胞系经光学显微镜和电子显微镜检查为具有明显恶性特征的上皮样细胞。细胞群体倍增时间为 27.8h; 细胞分裂指数平均为 30.6%, 最高为 58.9%; 染色体众数为 73—84, 同种动物移植率为 75%, 淋巴结和肺内转移均为 100%^[19]。经动物移植后证明建系后仍保持双向转移的特征。这是国内首次报道的具有双向转移特性的动物子宫颈癌的细胞系。它对今后研究淋巴道与血道转移之间关系及转移机制是一个有用的工具。

利用以上转移模型进行了以下实验性探讨: 1) 根据实验性淋巴转移过程的观察^[14,15] 结合自发转移过程的研究^[17], 将淋巴转移过程分为 7 个主要步骤 (详见图 4): 即 i. 瘤细胞从瘤主体离开, 侵入淋巴管 (也称转移前侵袭); ii. 瘤细胞在血管内运行^[15]; iii. 瘤细胞进入输入淋巴管; iv. 单个瘤细胞进入淋巴结的边缘窦内; v. 瘤细胞积聚在边缘窦内, 与窦内皮密切接触, 而开始增殖形成小的转移灶; vi. 瘤细胞继续由边缘窦向中间窦侵袭; vii. 最后瘤细胞侵入髓窦, 占居全淋巴结, 并可通过输出淋巴管向其它淋巴结运行形成再转移, 也可向淋巴结包膜侵袭。2) 通过以上转移模型研究^[16-18] 和不同部位移植后探讨移植部位和转移关系的观察^[26], 对血道转移部位及其来源 (接种部位) 之间关系提出了一个详细的图解 (图 5)。根据我们的实验结果大致可分为三种情况: i. 瘤细胞进入大循环的静脉系统后, 经小循环到肺, 也可经大循环的动脉系统到达肾或肝, 后者可见于皮下, 肌肉和静脉内接种瘤细胞后完成^[16,17,18,26]; ii. 瘤细胞经过门静脉系统直接到肝, 如脾内直接移植^[26,27]; iii. 淋巴道转移的瘤细胞, 到晚期

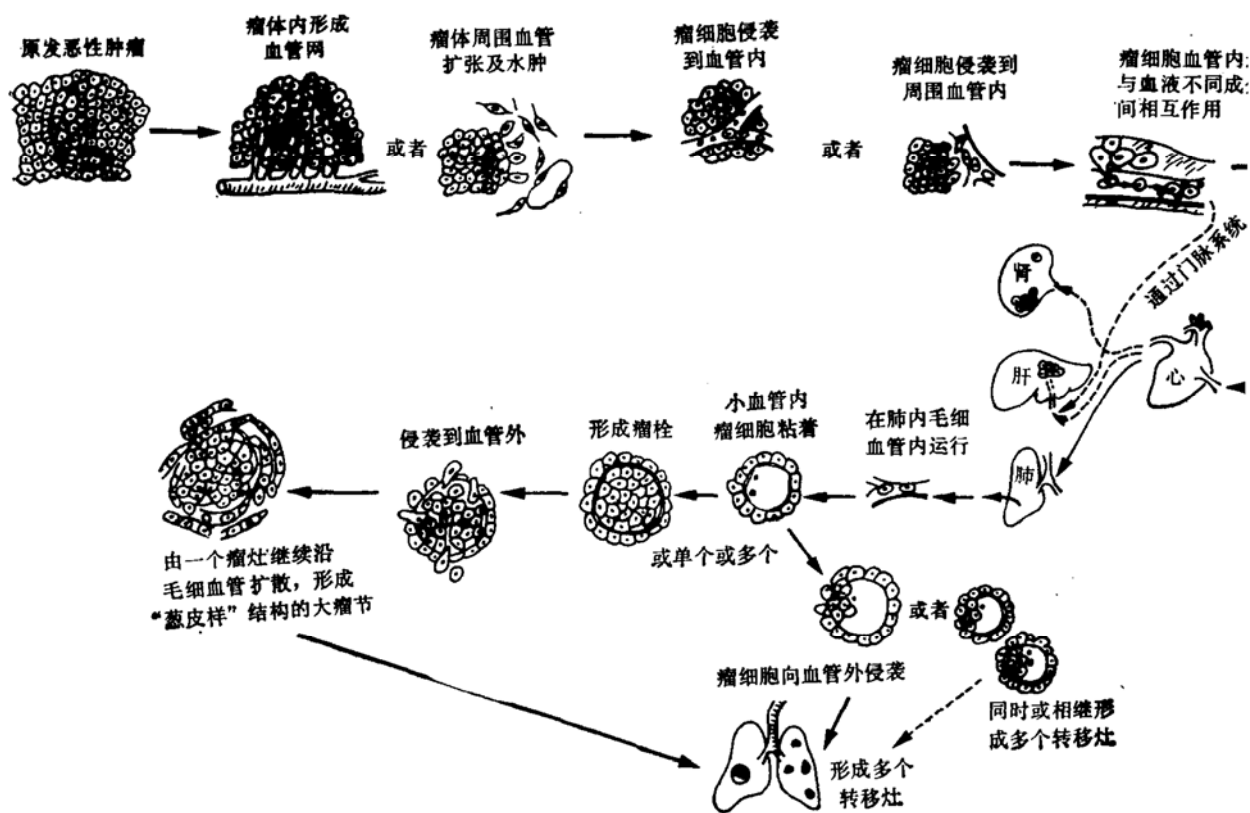


图 5 血道转移的多步骤、多部位图解

也可进入血循环发生广泛血道转移。以上结果与临床病理所观察结果相似。瘤细胞从侵入血管到形成转移灶要经过远距离旅行和遭到宿主不同因素作用。Fidler^[28]指出转移的发展依赖于宿主因素和恶性瘤细胞固有的特征之间相互作用。转移过程是高选择的过程。大量瘤细胞进入血管后大部分可遭到死亡,只有部分细胞能存活下来。因此,当在血管和淋巴管内有瘤细胞存在,尚未发生转移,这不能称为转移形成;只有当瘤细胞在远处器官内形成转移灶后,方可称为转移形成。总之转移过程是一个很复杂的过程,其机制尚待深入研究。

根据以上综合实验结果我们初步提出血道转移过程3个阶段的初步看法: i. 瘤细胞在血流中运行阶段。当瘤细胞脱离瘤主体后,进入血管腔内并在其内运行,到滞留和寄宿之前; ii. 肿瘤转移灶形成阶段。即瘤细胞在靶器官或组织内滞留,寄宿后,并开始增殖而形成典型的转移灶(继发瘤); iii. 转移灶继续发展和扩散阶段,即瘤细胞形成转移灶后继续发展,同时向周围组织侵袭或转移到其它部位发生再转移,即为晚期。许多作者把转移过程分为5个阶段^[29],即 i. 肿瘤细胞从原发瘤脱落; ii. 肿瘤细胞对周围组织、血管和淋巴管侵袭; iii. 肿瘤细胞在循环中的运行和滞留; iv. 肿瘤细胞穿出血管,淋巴管; v. 肿瘤细胞的生长、繁殖及转移灶形成。本文将血道转移过程分为3个阶段,可能更接近于临床上应用,第1和第2阶段可能为临床治疗良好时机。在这个时期瘤细胞处于不稳定阶段,易受宿主不同因素影响。第3阶段瘤细胞已经过宿主高度筛选,其已适应于宿主环境,而可能存活的瘤细胞皆属高潜能转移力的细胞、这阶段治疗可能比较困难、宿主因素也不会起到应有作用。这仅是初步推测,尚待进一步验证。

参 考 文 献

- [1] Roos, E. and Dingemans, K. P., *Biochimica et Biophysica Acta*, 560(1979), 135—166.
- [2] Hart, I. R., in *Invasion. Experimental and Clinical Implications* (Eds. Mareel, M. and Calman, K. K.), Oxford, New York, Tokyo, Oxford University Press, 1984, 63—78.
- [3] Morcel, M., *International Review of Experimental Pathology*, 22(1980), 65—129.
- [4] 杨简等, 中华病理学杂志, 11(1982), 11—13.
- [5] Gao Jin et al., *Path. Res. pract.*, 174(1982), 325—341.
- [6] 高进等, 中华肿瘤杂志, 5(1983), 89—93.
- [7] Gao Jin et al., *Clin. Expl. Metastasis*, 2(1984), 205—212.
- [8] 高进等, 中国医学科学院学报, 4(1982), 162—165.
- [9] ———, 中华肿瘤杂志, 6(1984), 331—334.
- [10] 薛克勋等, 解剖学报, 15(1984), 194—197.
- [11] 高进等, 中华肿瘤杂志, 6(1984), 247—249.
- [12] Miller, S. C. et al., *J. Cell Biol.*, 12(1977), 511—529.
- [13] de Ridder, L. et al., *Cancer Res.*, 35(1975), 3164—3171.
- [14] 高进等, 中国医学科学院学报, 3(增刊2)(1981), 53—56.
- [15] 钱书森等, 解剖学报, 14(1983), 204—214.
- [16] 薛克勋等, 中华病理学杂志, 16(1987), 2: 140—142.
- [17] 钱书森等, 同上, 12(1983), 281—284.
- [18] 李宝贵等, 解剖学报, 1987, (待发表).
- [19] 钱书森等, 中华肿瘤杂志, 8(1986), 324—327.
- [20] ———, 同上, 9(1987), 261—264.
- [21] 孙异临等, 解剖学报, 13(1982), 97—102.
- [22] 凌茂英等, 中华病理学杂志, 13(1984), 190—192.
- [23] 张兆伟等, 中华肿瘤杂志, 7(1985), 83—86.
- [24] Fidler, I. J., *Nature, New Biol.*, 242(1973), 148—149.

-
- [25] Poste, G. and Fidler, I. J., *Nature* (Lond.), **283** (1980), 139—146.
- [26] 高进、薛克勋, 病理生理学报, 1987, (待发表).
- [27] 薛克勋、高进, 中国医学科学院学报, 1987, (待发表).
- [28] Fidler, I. J., *Cancer Res.*, **38**(1978), 2651—2660.
- [29] 雷俊毅, 国外医学肿瘤分册, 1984, 2: 93-97.