

# 金龙蛇颗粒含药血清对人淋巴管内皮细胞体外成管、迁移及凋亡的影响

冯守含<sup>1</sup> 顾雨芳<sup>2</sup> 徐晶钰<sup>2</sup> 张映城<sup>2</sup> 赵颖<sup>2</sup> 陆烨<sup>2</sup> 岳小强<sup>2</sup> 李勇进<sup>2</sup>

**摘要** **目的** 观察金龙蛇颗粒含药血清(Jinlongshe Granule drug-containing serum, JG-DS)对人淋巴管内皮细胞(human lymphatic endothelial cells, HLECs)体外成管、迁移及凋亡的影响。**方法** 制备 JG-DS;将第 3 代 HLECs 分为 2 组:对照组(采用生理盐水血清进行培养)和实验组(采用 JG-DS 培养)。两组细胞培养 12 h 后,采用 Matrigel 基质胶成管实验检测 HLECs 成管能力;Transwell 法检测 HLECs 迁移能力;采用流式细胞术、Annexin-V-FITC/PI 双染法检测 HLECs 凋亡率。**结果** 10% JG-DS 作用 12 h 后,HLECs 小管总长度为  $(3\,084.49 \pm 326.27) \mu\text{m}$ ,明显低于对照组的  $(7\,058.93 \pm 4\,567.39) \mu\text{m}$ ,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );HLECs 迁移指数为  $(99 \pm 26)$  个,明显低于对照组的  $(160 \pm 32)$  个,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。两组 HLECs 凋亡率比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 金龙蛇颗粒对 HLECs 体外成管及迁移有抑制作用,可能是其抑制肿瘤微淋巴管生成的机制之一。

**关键词** 金龙蛇颗粒含药血清;人淋巴管内皮细胞;体外成管;迁移;凋亡

Effect of Jinlongshe Granule Drug-containing Serum on Tube Formation, Migration and Apoptosis of Human Lymphatic Endothelial Cells *in vitro* FENG Shou-han<sup>1</sup>, GU Yu-fang<sup>2</sup>, XU Jing-yu<sup>2</sup>, ZHANG Ying-cheng<sup>2</sup>, ZHAO Ying<sup>2</sup>, LU Ye<sup>2</sup>, YUE Xiao-qiang, and LI Yong-jin<sup>2</sup> <sup>1</sup> Department of Oncology, Huzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang (313000); <sup>2</sup> Department of Traditional Chinese Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai (200003)

**ABSTRACT** **Objective** To observe the inhibitory effect of Jinlongshe Granule drug-containing serum (JG-DS) on tube formation, migration, and apoptosis of human lymphatic endothelial cells (HLECs) *in vitro*. **Methods** JG-DS was prepared. The 3rd-passage HLECs were divided into the control group (cultured with normal saline containing serum) and the experimental group (cultured with JG-DS). After cultured for 12 h, the tube formation ability was detected by Matrigel assay, and the migration ability was determined by Transwell assay in the two groups. Cell apoptosis rate was detected by flow cytometry and Annexin-V-FITC/PI staining method. **Results** The total length of tube was  $(3\,084.49 \pm 326.27) \mu\text{m}$  after acted by 10% JG-DS for 12 h, significantly shorter than that of the control group  $(7\,058.93 \pm 4\,567.39) \mu\text{m}$  ( $P < 0.01$ ). The migration number of HLECs was  $(99 \pm 26)$ , obviously lower than that of the control group  $(160 \pm 32)$ ;  $P < 0.05$ . The apoptosis rate of the two groups was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** JG could inhibit the tube formation and migration of HLECs *in vitro*, which might be one of mechanisms for inhibiting tumor micro-lymphatics.

**KEYWORDS** Jinlongshe Granule drug-containing serum; human lymphatic endothelial cell; *in vitro*-tube formation; migration; apoptosis

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81173404)

作者单位:1.浙江省湖州市中医院肿瘤科(浙江 313000);2.第二军医大学附属长征医院中医科(上海 200003)

通讯作者:李勇进, Tel: 021-81885476, E-mail: lyjhma0713@hotmail.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.10.1235

人淋巴管内皮细胞(human lymphatic endothelial cells, HLECs)是淋巴管腔内表面的一种单层扁平上皮细胞层,是构成淋巴管壁的主要结构。HLECs 的重要性表现在许多生理病理过程中,不仅能维持体液平衡、参与淋巴细胞的再循环、组织液蛋白质的运输及机体免疫反应,还在疾病过程中扮演重要角色,如炎症的扩散或肿瘤细胞的淋巴结转移<sup>[1]</sup>。淋巴管新生的基本过程包括淋巴管内皮细胞增殖、迁移和管状结构的形成<sup>[2]</sup>。研究发现,在发生淋巴结转移的肿瘤中常有淋巴管的增生和扩张,表明淋巴管新生在肿瘤淋巴转移中具有重要作用<sup>[3-5]</sup>。微淋巴管密度(lymphatic microvessel density, LMVD)是评价肿瘤淋巴管生成的重要指标,血管内皮生长因子-C(vascular endothelial growth factor C, VEGF-C)及受体血管内皮生长因子受体-3(vascular endothelial growth factor receptor 3, VEGFR-3)目前被认为是淋巴管生成中的关键性因子。近年来研究发现,通过影响淋巴管内皮细胞的迁移、凋亡及管样结构的形成,可影响肿瘤微淋巴管的生成<sup>[6-8]</sup>。本课题组前期研究表明,消痰散结方可降低人胃腺癌 MKN-45 原位移植瘤组织 LMVD,下调 VEGF-C 及 VEGFR-3 表达水平<sup>[9]</sup>,但相关机制尚不明确。本研究通过体外培养 HLECs,采用基质胶成管实验、凋亡、迁移等方法,探讨金龙蛇颗粒含药血清抑制肿瘤微淋巴管生成的机制。

## 材料与方法

1 细胞来源 HLECs 原代细胞购自美国 ScienCell 公司(批号:2500,规格: $5 \times 10^5$ /vial)。

2 动物 健康 SD 大鼠 16 只,雌雄各半,8 周龄,体重 160~200 g,由中国科学院上海实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:SCXK(沪)20120002,动物使用许可证号:SYXK(沪)2012002。实验动物于 SPF 级条件下饲养。

3 药物 金龙蛇颗粒由半夏 15 g 天南星 15 g 茯苓 15 g 白芥子 9 g 陈皮 9 g 全蝎 6 g 鸡内金 15 g 炙甘草 6 g 组成,原生药均购自上海雷允上药业有限公司,产地明确,经第二军医大学药学院生药教研室鉴定,由长征医院药材科制剂室制备。常规方法煎煮,浓缩至含生药 10.36 g/mL(6 倍颗粒浓度)的金龙蛇颗粒浓浸膏备用。

4 试剂与仪器 ECM 培养基(批号:1001)、内皮细胞生长补充物(endothelial cells growth supplements, ECGS, 批号:1052)、P/S 双抗(批号:0503)、胰蛋白酶(批号:0103)、胰蛋白酶中和液(批号:0113)、

Fibronectin(批号:8488)均购自美国 ScienCell 公司;基质胶购自美国 BD 公司(批号:354234);胎牛血清购自 GIBCO-BRL 公司(批号:0500);Trancowell 非接触式共培养小室购自 Corning 公司(批号:3422、3428);结晶紫细胞群落染色试剂盒购自 GenMed 公司(批号:GMS10007);Annexin V-FITC/PI 双染法细胞凋亡检测试剂盒购自上海锐赛生物技术有限公司(批号:CD003-2)。流式细胞仪购自 Becton Dickinson 公司(型号:FASARIA Cell Sorter)。

5 药物血清制备及样本采集 采用随机数字表法将 16 只大鼠分为实验组及对照组,每组 8 只。从第一天开始,实验组大鼠每天以 1.2 mL 金龙蛇颗粒浓浸膏灌胃(相当于 10 倍临床用量);对照组灌服等量生理盐水,均每日 2 次,共 5 天,第 5 天末次灌胃 2 h 后,摘眼球取血。取血后室温静置 1 h,5 000 r/min 离心 10 min,56 ℃ 水浴灭活 30 min,经 0.22  $\mu$ m 滤膜除菌,分装, -20 ℃ 冻存。

6 细胞培养 以 2 mL Fibronectin(10  $\mu$ g/mL)包被培养皿,HLECs 贴壁生长于含 5% 胎牛血清、1% P/S 双抗、1% ECGS 的 DCM 培养基中,置于含 5% CO<sub>2</sub>、37 ℃ 恒温培养箱,隔日换液 1 次,5~7 天传代 1 次,传至第 3 代后,取状态良好的细胞进行实验。

## 7 观察指标及检测方法

7.1 HLECs 成管能力检测 采用 Matrigel 基质胶成管实验法。参照参考文献[10],24 孔板每孔加 BD 胶 400  $\mu$ L,待胶凝固后,以备种细胞。选择处于对数期的 HLECs,消化悬浮细胞后,细胞计数,按每孔  $1 \times 10^5$  个细胞种于 6 孔板中,24 h 后同步化 12 h(同步化液:ECM + 1% 血清 + 1% ECGS + 1% P/S),按以下分为 2 组加入不同的培养基刺激 12 h:对照组予 1 800  $\mu$ L ECM 完全培养基 + 200  $\mu$ L 生理盐水血清 + 2  $\mu$ L VEGF-C;实验组予 1 800  $\mu$ L ECM 完全培养基 + 200  $\mu$ L 10% 金龙蛇含药血清 + 2  $\mu$ L VEGF-C。将上步骤中处理过的细胞消化、离心、重悬后,按每孔  $1 \times 10^4$  个细胞接种于铺好基质胶的 24 孔板中,每组 6 个复孔,置于 37 ℃,5% CO<sub>2</sub> 孵箱分别培养 4、6、8、12 h,置于倒置显微镜下观察,在 100 倍视野下拍照。每个样本镜下随机选取 3 个视野,应用 Image-Pro Plus 软件计算形成的平均淋巴小管总长度。

7.2 HLECs 迁移能力检测 采用 Transwell 迁移实验。参照参考文献[11],按每孔  $1 \times 10^5$  个细胞种于 6 孔板中,24 h 后同步化 12 h,按步骤 7.1 分为 2 组:对照组(生理盐水血清组)和实验组(金龙蛇含药血清组),培养 12 h 后,同步化 12 h,将处理过的

细胞接种至小室内。选择孔径为 8  $\mu\text{m}$  的上室和 24 孔培养板(下室)建立 Transwell 迁移系统,将 0.1 mL(含细胞  $1 \times 10^4$  个) HLECs 接种于上室中,将 0.65 mL 完全培养基加入下室。48 h 后取出上室,用棉签擦去内表面的 HLECs。将上室置于 4% 多聚甲醛固定 15 min,参照结晶紫细胞群落染色试剂盒说明书行结晶紫染色。倒置相差显微镜下照相,计数迁移到上室外表面的细胞数目。每组 3 个样本,每个样本计数 5 个视野( $\times 20$ )的细胞数,取平均值进行比较。

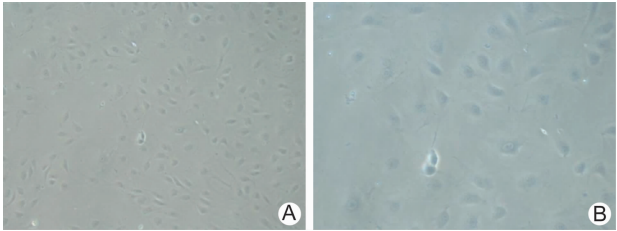
**7.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率** 参照参考文献[12],选择处于对数期的 HLECs,消化悬浮细胞后,细胞计数,按每孔  $1 \times 10^5$  个细胞种于 6 孔板中,37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养,待细胞融合度达到约 30%~40%,按以下分组加入不同的培养基刺激 12 h。对照组予 200  $\mu\text{L}$  生理盐水血清 + 2  $\mu\text{L}$  VEGF-C;实验组予 200  $\mu\text{L}$  金龙蛇颗粒含药血清 + 2  $\mu\text{L}$  VEGF-C,分别收集各孔中上清,4  $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 r/min 离心 5 min,收集细胞;并将两组贴壁细胞用 0.25% 胰酶消化后,4  $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞,将 2 次细胞混合, PBS 洗涤细胞 2 次,1 000 r/min 离心 5 min,收集细胞。参照 Annexin V-FITC/PI 双染法细胞凋亡检测试剂盒说明书,分别加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC、10  $\mu\text{L}$  PI 及 400  $\mu\text{L}$  结合缓冲液后,采用流式细胞仪上样检测。每组设 3 个复孔。

**8 统计学方法** 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组比较采用 LSD- $t$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

结 果

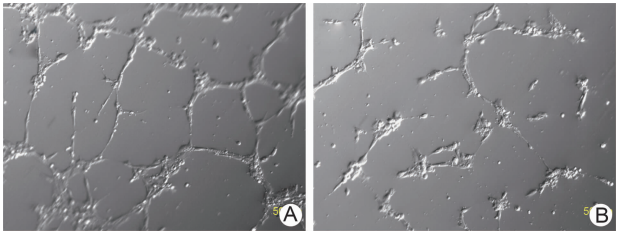
**1 HLECs 形态观察(图 1)** 复苏后 6~8 h 可见有淋巴管内皮细胞贴壁生长,在铺有纤维连接蛋白 FN 的培养皿内能较好地贴附、生长,外形呈典型的扁椭圆或铺路石状;约 3 天形成细胞集落,可见细胞聚集成团,呈短梭形,放射状展开;约 5 天梭形淋巴管内皮细胞生长铺满培养皿。

**2 两组 HLECs 体外成管情况及淋巴管长度比较** 倒置相差显微镜观察发现,6 h 时两组管样结构形成最为明显,实验组 HLECs 形成不完全的、松散的管状结构;对照组均形成完整的管状结构(图 2)。实验组微淋巴管形成长度为  $(3\,084.49 \pm 326.27) \mu\text{m}$ ,明显短于对照组的  $(7\,058.93 \pm 4\,567.39) \mu\text{m}$ ,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。



注:A 为 40 倍视野;B 为 100 倍视野

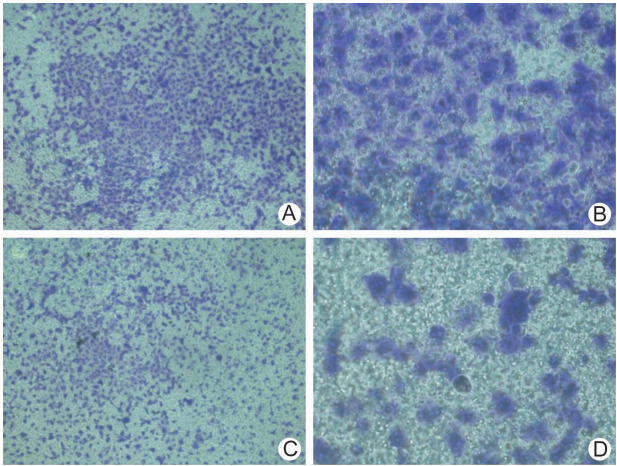
图 1 HLECs 形态观察



注:A 为对照组;B 为实验组干预 6 h

图 2 两组 HLECs 成管情况 (倒置相差显微镜,  $\times 100$ )

**3 两组 HLECs 迁移数目比较(图 3)** 干预 48 h 后,对照组 HLECs 迁移数目为  $(160 \pm 32)$  个,实验组为  $(99 \pm 26)$  个,较对照组明显减少 ( $P < 0.05$ )。



注: A、B 为对照组; C、D 为实验组;A、C 及 B、D 分别为  $\times 4$ ,  $\times 20$  倍视野

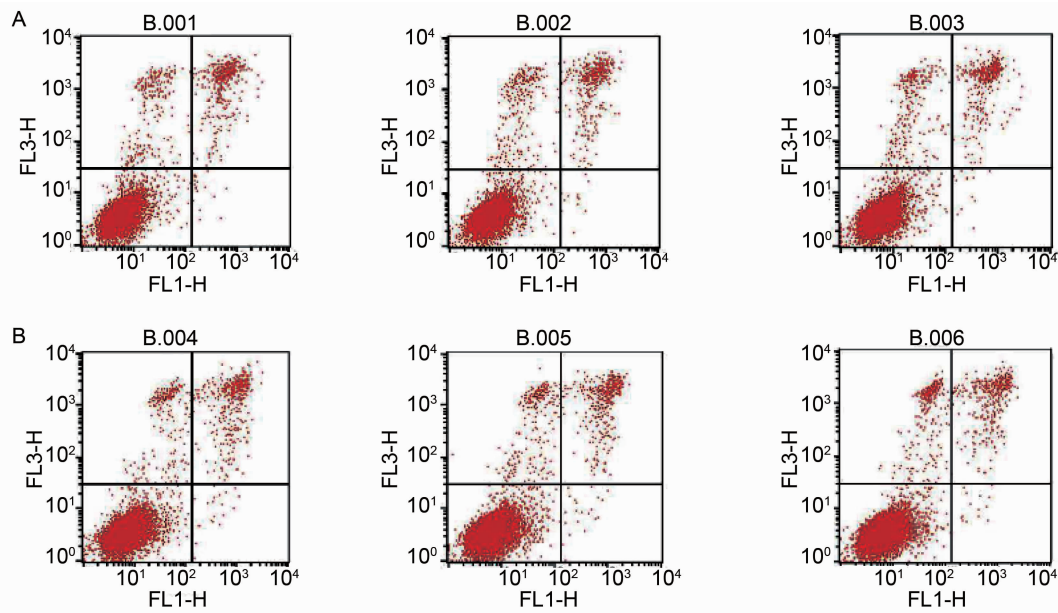
图 3 两组 HLECs 迁移数目比较(结晶紫细胞群落染色)

**4 两组 HLECs 凋亡率比较(图 4、表 1)** 两组细胞凋亡率比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 1 两组 HLECs 凋亡率比较 (%)

| 组别 | n | LL     | UR + LR |
|----|---|--------|---------|
| 对照 | 3 | 91.830 | 4.990   |
| 实验 | 3 | 92.030 | 4.897   |

注: LL 为阴性对照的正常细胞;LR 为早期凋亡细胞;UR 为晚期凋亡及死亡细胞



注:A 为对照组;B 为实验组

图 4 两组流式细胞仪检测结果比较

## 讨 论

浸润与转移是恶性肿瘤的重要生物学特性,淋巴管是实体肿瘤转移的最早通路之一。淋巴管生成(lymphangiogenesis)作为肿瘤淋巴转移的机制已被多数学者认可,但其分子机制尚未明确<sup>[13-15]</sup>。研究发现,LMVD 与多种肿瘤淋巴浸润、淋巴结转移、TNM 分期、恶性程度、不良预后等相关<sup>[16-20]</sup>。淋巴转移是肿瘤发展过程中的早期事件及影响预后的关键因素,高密度的淋巴管可能促使肿瘤细胞与扩增的淋巴管接触并侵入淋巴管导致淋巴结及远处转移,加速病程的进展。因此,针对新生淋巴管为治疗靶点,抗肿瘤淋巴管生成及淋巴转移治疗将有望成为继抗肿瘤血管治疗之后的又一抗肿瘤转移的生物治疗新模式。

肿瘤淋巴管生成的机制十分复杂,目前尚无定论。有研究认为,肿瘤淋巴管生成是从循环中的淋巴内皮祖细胞生成新的淋巴管<sup>[21]</sup>。目前多项研究认为,肿瘤淋巴管生成是指在肿瘤原位癌组织周围或癌组织内形成新的毛细淋巴管,为宿主脉管胚胎主静脉或已存在的淋巴管通过芽生及进一步分化从而形成新的毛细淋巴管的过程<sup>[22-26]</sup>。淋巴管生成和血管生成的过程相似,同样可由淋巴管内皮细胞分化而成,在趋化因子和大量生长因子的作用下,淋巴管内皮细胞迁移、增殖和形成管样结构,形成新的淋巴管<sup>[27-29]</sup>。

VEGF 家族中,VEGF-C 和 VEGF-D 通过作用于 VEGFR-3 在淋巴管形成过程中起重要作用<sup>[24,30,31]</sup>。

在肿瘤中,基质细胞和肿瘤细胞都可以过量表达淋巴管新生因子 VEGF-C 和 VEGF-D,通过激活 VEGFR-3 刺激肿瘤周围淋巴内皮细胞增殖、向肿瘤迁移,形成新生的淋巴管,增强肿瘤细胞的转移能力。Liu D 等<sup>[32]</sup>研究发现,通过增强肿瘤细胞中 VEGF-C 表达,同源盒基因 Six1 具有促进体外培养的淋巴管内皮细胞的迁移和管样结构形成的作用,同时体内研究也证实其具有诱导淋巴管生成的作用;Six1 促进 TGF- $\beta$  诱导激活 SMAD2 / 3 并与 SMAD 通路共同调节 VEGF-C 的表达;TGF- $\beta$  除能促进 VEGF-C 表达,还可通过直接抑制淋巴管内皮细胞管样结构形成从而抑制淋巴管的生成。此外,许多血管生成抑制因子,如内皮素<sup>[33]</sup>、血小板因子-4 及活化受体 CLEC-2<sup>[8,34]</sup> 和干扰素  $\gamma$ <sup>[35]</sup> 等对淋巴管内皮细胞的增殖和游走有明显抑制作用,并可促进细胞凋亡,从而抑制淋巴管的生成。Shin K 等<sup>[36]</sup>研究表明,TH2 细胞及其细胞因子 IL-4 和 IL-13 可下调淋巴管内皮细胞必需的转录因子,并抑制其管样结构形成,对淋巴管形成有抑制作用。

金龙蛇颗粒是根据魏品康教授抗肿瘤临床经验方“消痰散结方”研制而成,通过多项实验研究发现,能多靶点、多途径抑制胃癌增殖,预防其复发转移<sup>[37-39]</sup>。前期研究发现,消痰散结方能减低 SGC-7901 胃原位移植瘤局部浸润和淋巴转移<sup>[40]</sup>;降低人胃腺癌 MKN-45 原位移植瘤组织中微淋巴管的密度和 VEGF-C 及 VEGFR-3 的表达<sup>[9]</sup>。本研究以 VEGF-C 刺激 HLECs,模拟肿瘤组织周围微环境,以体外实验观察金龙蛇颗粒对

HLECs 管样结构形成、迁移及凋亡活动的影响。通过体外成管及迁移实验发现,生理盐水血清组 HLECs 能形成明显的管样结构并且发生明显迁移,提示 HLECs 管样结构形成及细胞迁移活动参与淋巴管生成过程。与对照组比较,金龙蛇颗粒含药血清能直接作用于 HLECs,显著抑制其在基质胶中延伸生长、抑制其管样结构形成及迁移能力,验证了金龙蛇颗粒对 HLECs 淋巴管生成能力的抑制作用;但两组凋亡影响率未见明显差异,可能与药物血清浓度设定有关,未达到有效抑制凋亡浓度,对于药物血清浓度的设定及时间、剂量依赖效应有待后续研究。

综上,本研究观察给予金龙蛇颗粒药物血清干预后 HLECs 体外成管及迁移活动的变化,结果表明金龙蛇颗粒能较好抑制 HLECs 体外成管及迁移活动,从而直接抑制新生淋巴管生成。这可能是抗淋巴管生成的机制之一,也为金龙蛇颗粒临床防复发转移提供部分理论依据。

#### 参 考 文 献

- [1] Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease[J]. Nature, 2005, 438(7070): 946–953.
- [2] Takeda K, Sowa Y, Nishino K, et al. Adipose-derived stem cells promote proliferation, migration, and tube formation of lymphatic endothelial cells *in vitro* by secreting lymphangiogenic factors[J]. Ann Plast Surg, 2015, 74(6): 728–736.
- [3] Wang CA, Jedlicka P, Patrick AN, et al. SIX1 induces lymphangiogenesis and metastasis via up-regulation of VEGF-C in mouse models of breast cancer [J]. J Clin Invest, 2012, 122(5): 1895–1906.
- [4] Lyons TR, Borges VF, Betts CB, et al. Cyclooxygenase-2-dependent lymphangiogenesis promotes nodal metastasis of postpartum breast cancer[J]. J Clin Invest, 2014, 124(9): 3901–3912.
- [5] Liu L, Lin C, Liang W, et al. TBL1XR1 promotes lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Gut, 2015, 64(1): 26–36.
- [6] Albrecht I, Bieri R, Leu A, et al. Paralemmin-1 is expressed in lymphatic endothelial cells and modulates cell migration, cell maturation and tumor lymphangiogenesis[J]. Angiogenesis, 2013, 16(4): 795–807.
- [7] Wang J, Guo Y, Zhang BC, et al. Induction of apoptosis and inhibition of cell migration and tube-like formation by dihydroartemisinin in murine lymphatic endothelial cells [J]. Pharmacology, 2007, 80(4): 207–218.
- [8] Osada M, Inoue O, Ding G, et al. Platelet activation receptor CLEC-2 regulates blood/lymphatic vessel separation by inhibiting proliferation, migration, and tube formation of lymphatic endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2012, 287(26): 22241–22252.
- [9] 庞斌, 魏品康, 李勇进, 等. 消痰散结方对裸鼠 MKN-45 人胃癌组织中 VEGF-C 及其受体 VEGFR-3 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(2): 204–208.
- [10] Cheng BB, Yan ZQ, Yao QP, et al. Association of SIRT1 expression with shear stress induced endothelial progenitor cell differentiation[J]. J Cell Biochem, 2012, 113(12): 3663–3671.
- [11] Li YW, Wang JX, Yin X, et al. Decreased expression of GATA2 promoted proliferation, migration and invasion of HepG2 *in vitro* and correlated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e87505.
- [12] Yuan X, Chen K, He H, et al. Effect of GLP-1 on high glucose-induced human umbilical vein endothelial cell apoptosis and mechanism[J]. J Central Southern Univ, 2013, 38(10): 1029–1034.
- [13] Hirakawa S, Detmar M, Kerjaschki D, et al. Nodal lymphangiogenesis and metastasis: Role of tumor-induced lymphatic vessel activation in extramammary Paget's disease[J]. Am J Pathol, 2009, 175(5): 2235–2248.
- [14] Schoppmann SF, Tamandl D, Roberts L, et al. HER2/neu expression correlates with vascular endothelial growth factor-C and lymphangiogenesis in lymph node-positive breast cancer[J]. Ann Oncol, 2010, 21(5): 955–960.
- [15] He Y, Rajantie I, Pajusola K, et al. Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels [J]. Cancer Res, 2005, 65(11): 4739–4746.
- [16] Zhou H, Liu JK, Chen SX, et al. Lymphatic microvessel density combined with CT used in the diagnosis of mediastinal and hilar lymph node metastasis of non-small-cell lung cancer [J]. Arch Med Res, 2012, 43(2): 132–138.
- [17] Coskun U, Akyurek N, Dursun A, et al. Peritumoral lymphatic microvessel density associated with tumor progression and poor prognosis in gastric carcinoma [J]. J Surg Res, 2010, 164(1): 110–115.
- [18] Matsumoto K, Nakayama Y, Inoue Y, et al. Lymphatic microvessel density is an independent prognostic factor in colorectal cancer[J]. Dis Colon Rectum, 2007, 50(3): 308–314.
- [19] Saad RS, Kordunsky L, Liu YL, et al. Lymphatic microvessel density as prognostic marker in colorectal cancer[J]. Mod Pathol, 2006, 19(10): 1317–1323.

- [20] Pastushenko I, Vermeulen PB, Carapeto FJ, et al. Blood microvessel density, lymphatic microvessel density and lymphatic invasion in predicting melanoma metastases: systematic review and meta-analysis [J]. *Br J Dermatol*, 2014, 170(1): 66–77.
- [21] Salven P, Mustjoki S, Alitalo R, et al. VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34 + lymphatic/vascular endothelial precursor cells [J]. *Blood*, 2003, 101(1): 168–172.
- [22] He Y, Rajantie I, Ilmonen M, et al. Preexisting lymphatic endothelium but not endothelial progenitor cells are essential for tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(11): 3737–3740.
- [23] Kodama M, Kitadai Y, Sumida T, et al. Expression of platelet-derived growth factor (PDGF)-B and PDGF-receptor  $\beta$  is associated with lymphatic metastasis in human gastric carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(9): 1984–1989.
- [24] Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis [J]. *Nat Med*, 2001, 7(2): 192–198.
- [25] 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.
- [26] Mattila MM, Ruohola JK, Karpanen T, et al. VEGF-C induced lymphangiogenesis is associated with lymph node metastasis in orthotopic MCF-7 tumors [J]. *Int J Cancer*, 2002, 98(6): 946–951.
- [27] Siriwardena BS, Kudo Y, Ogawa I, et al. VEGF-C is associated with lymphatic status and invasion in oral cancer [J]. *J Clin Pathol*, 2008, 61(1): 103–108.
- [28] Mäkinen T, Veikkola T, Mustjoki S, et al. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3 [J]. *EMBO J*, 2001, 20(17): 4762–4773.
- [29] Salameh A, Galvagni F, Bardelli M, et al. Direct recruitment of CRK and GRB2 to VEGFR-3 induces proliferation, migration, and survival of endothelial cells through the activation of ERK, AKT, and JNK pathways [J]. *Blood*, 2005, 106(10): 3423–3431.
- [30] Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics [J]. *Nat Med*, 2001, 7(2): 186–191.
- [31] Cao R, Ji H, Feng N, et al. Collaborative interplay between FGF-2 and VEGF-C promotes lymphangiogenesis and metastasis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(39): 15894–15899.
- [32] Liu D, Li L, Zhang XX, et al. SIX1 promotes tumor lymphangiogenesis by coordinating TGF $\beta$  signals that increase expression of VEGF-C [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(19): 5597–5607.
- [33] Zhuo W, Luo C, Wang X, et al. Endostatin inhibits tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis via cell surface nucleolin on lymphangiogenic endothelial cells [J]. *J Pathol*, 2010, 222(3): 249–260.
- [34] Bertozzi CC, Schmaier AA, Mericko P, et al. Platelets regulate lymphatic vascular development through CLEC-2-SLP-76 signaling [J]. *Blood*, 2010, 116(4): 661–670.
- [35] Kataru RP, Kim H, Jang C, et al. T lymphocytes negatively regulate lymph node lymphatic vessel formation [J]. *Immunity*, 2011, 34(1): 96–107.
- [36] Shin K, Kataru RP, Park HJ, et al. TH2 cells and their cytokines regulate formation and function of lymphatic vessels [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6196.
- [37] 郭晓冬, 魏品康. 消痰散结方对裸鼠 MKN-5 胃腺癌组织中 PCNA 表达的影响 [J]. *广州中医药大学学报*, 2000, 17(2): 152–154.
- [38] 李峻, 魏品康, 许玲, 等. 消痰散结方对血管内皮细胞小管形成的影响 [J]. *成都中医药大学学报*, 2003, 26(4): 25–26.
- [39] 苏晓妹, 魏品康, 许玲, 等. 消痰散结方抑制胃癌生长和转移的实验研究 [J]. *成都中医药大学学报*, 2003, 26(4): 20–22.
- [40] 许玲, 魏品康, 陈亚琳, 等. 中药消痰散结方抑制裸鼠原位移植人胃癌 SGC-7901 的生长转移 [J]. *世界华人消化杂志*, 2004, 12(5): 1015–1020.

(收稿: 2015-05-10 修回: 2016-05-27)