

[文章编号] 1000-1182(2010)05-0475-04

# 基质金属蛋白酶组织抑制剂-2过表达对人成釉细胞瘤鸡胚尿囊膜移植瘤的抑制作用

张磊涛<sup>1</sup> 李伟忠<sup>1</sup> 黄洪章<sup>2</sup> 曾东林<sup>2</sup> 陶谦<sup>2</sup>

(1.南方医科大学南方医院 口腔科, 广东 广州 510515;

2.中山大学光华口腔医院 口腔颌面外科, 广东 广州 510055)

**[摘要]** 目的 探讨基质金属蛋白酶组织抑制剂-2(TIMP-2)基因过表达对人成釉细胞瘤鸡胚尿囊膜(CAM)移植瘤的抑制作用。方法 建立成釉细胞瘤的鸡胚尿囊膜移植瘤模型。将实验分组:空白对照组(Empt),脂质体转染组(Lipo),质粒转染组(P)。TIMP-2基因转染成釉细胞CAM移植瘤细胞后,测定移植瘤体积和瘤重;将移植瘤侵袭能力分为4个级别进行移植瘤病理检查。Western blot分析移植瘤基质金属蛋白酶-2(MMP-2)及TIMP-2蛋白的表达。结果 移植瘤能在鸡胚绒毛尿囊膜上生长。接种后第9天,转染质粒组的0级侵袭为7例、2级侵袭为1例、3级侵袭为0例。TIMP-2基因转染可以显著抑制成釉细胞CAM移植瘤的局部侵袭能力。质粒转染组TIMP-2表达明显高于空白组TIMP-2的表达( $P<0.05$ );质粒转染组MMP-2表达明显低于空白组MMP-2的表达( $P<0.05$ )。结论 成功建立成釉细胞瘤的CAM移植瘤模型。TIMP-2基因转染后,成釉细胞瘤CAM移植瘤的侵袭性生长被抑制。移植瘤的侵袭性生长被抑制的可能原因是由于特异性抑制MMP-2蛋白引起的。

**[关键词]** 成釉细胞瘤; 侵袭; 基质金属蛋白酶组织抑制剂-2; 移植瘤

**[中图分类号]** R 739.8 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2010.05.005

**Suppression to ameloblastoma xenografts of chicken embryo chorioallantoic membrane by tissue inhibitor of metalloproteinases-2** ZHANG Lei-tao<sup>1</sup>, LI Wei-zhong<sup>1</sup>, HUANG Hong-zhang<sup>2</sup>, ZENG Dong-lin<sup>2</sup>, TAO Qian<sup>2</sup>. (1. Dept. of Stomatology, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Guanghua College of Stomatology, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510055, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the invasiveness of xenografts on chicken embryo chorioallantoic membrane(CAM) after tissue inhibitor of metalloproteinase-2(TIMP-2) gene transfection. **Methods** Fresh ameloblastoma tissues were minced into 1-2 mm<sup>3</sup> and transplanted on the CAM. There were three groups named as control group(Empt), plasma transfection group(Lipo), and TIMP-2 gene transfection group(P). The specimens were respectively investigated by microscope in different spots after implanting. The volume of the xenografts and the weight of xenografts in the termination time of the experiment were recorded. The invasiveness of xenografts was divided into four grades by pathological examination. Western blot analysis was performed to investigate matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and TIMP-2 protein in xenografts. **Results** Ameloblastoma tissues can survive on CAM and the tumor cells may invade it on 5-7 days after implanting. At 9 d after implanting, the invasiveness grades in P group were 7 in grade 0, 1 in grade 2, 0 in grade 3. The expression of TIMP-2 protein in P group was significantly higher than that in Empt group( $P<0.05$ ). The expression of MMP-2 protein in P group was lower than that in Empt group( $P<0.05$ ). **Conclusion** The xenotransplanted tumor model of human ameloblastoma on CAM was successfully established. The invasiveness of ameloblastoma xenografts was suppressed might be due to TIMP-2 gene transfection.

**[Key words]** ameloblastoma; invasiveness; tissue inhibitor of metalloproteinase-2; xenografts

成釉细胞瘤(ameloblastoma, AM)是口腔颌面部最常见的牙源性肿瘤,约占牙源性肿瘤的59.3%<sup>[1]</sup>。

[收稿日期] 2009-02-23; [修回日期] 2009-09-30

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30471896);广东省自然科学基金资助项目(04300240)

[作者简介] 张磊涛(1974—),男,河南人,主治医师,博士

[通讯作者] 黄洪章, Tel: 020-83862558

AM虽为良性肿瘤,但具有局部侵袭性,肿瘤细胞常向骨小梁间侵袭生长。临床治疗容易复发,反复多次手术给患者造成严重的面部畸形,并有可能恶变,成釉细胞瘤的局部侵袭机制迄今尚未明了。鸡胚尿囊膜(chicken embryo chorioallantoic membrane, CAM)是鸡胚的外膜也是天然免疫缺陷宿主,常作

为移植性肿瘤的实验模型之一。基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2)是目前研究发现的与肿瘤侵袭关系最为密切的一种基质金属蛋白酶。已有的研究表明, MMP-2的调节具有3个水平, 即基因转录水平、酶原的活化激活水平、抑制剂水平。本课题组在前期研究中, 应用MMP-2的特异化学抑制剂Ro31-9790明显抑制了MMP-2的活性, 并使裸鼠肾包膜下AM移植瘤的生长被抑制。应用靶向RNA干扰技术, 特异性的使MMP-2基因沉默, 抑制了MMP-2基因的表达, AM的侵袭性被明显抑制, MMP-2与AM细胞的侵袭性密切相关。基质金属蛋白酶组织抑制剂-2(tissue inhibitor of metalloproteinase-2, TIMP-2)是MMP-2的天然抑制剂。为了进一步探讨TIMP-2基因转染对AM侵袭性生长的抑制作用, 本研究在构建成釉细胞瘤鸡胚尿囊膜移植瘤模型的基础上, 通过在移植瘤周围应用TIMP-2真核表达质粒pcDNA3.1(+)/GFP-TIMP-2, 研究TIMP-2基因转染在器官水平上对AM移植瘤的影响, 为进一步探讨TIMP-2基因转染的体内效果奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 成釉细胞瘤组织标本 新鲜AM标本取自中山大学附属口腔医院口腔颌面外科1例31岁男性住院患者。肿瘤位于下颌骨体, 术后病理证实为滤泡型AM, 并有部分肿瘤上皮鳞状化生。

1.1.2 鸡胚 购自广州江高集团种鸡场, 为5~6 d龄江村黄种鸡蛋。

1.1.3 实验试剂 0.3 mol·L<sup>-1</sup>盐酸胍乙醇溶液(Sigma公司, 美国); pcDNA3.1(+)/GFP-TIMP-2(中山大学附属第二医院中心实验室提供)。

### 1.2 方法

1.2.1 建立成釉细胞瘤的CAM移植瘤模型 将切取的AM组织标本于无菌条件下迅速放入含200 U·mL<sup>-1</sup>的青霉素、链霉素的无血清DMEM培养基中至4℃, 于超净台中将组织标本切碎, 使之成1~3 mm<sup>3</sup>的组织小块, 以13目的无菌不锈钢筛过筛, 取筛下的组织块, 再用20目无菌不锈钢筛过筛。取筛上的组织块用于接种, 以便使余留的组织块大小基本一致。接种AM组织块于CAM之上, 用透明胶纸封闭卵壳开口, 继续放在37℃, 50%~70%湿度的温箱中孵育。

1.2.2 TIMP-2基因转染成釉细胞CAM移植瘤细胞 90只接种有移植瘤的鸡胚按转染试剂的不同分3组, 每组鸡胚30只。每组转染试剂如下: 1)空白对照组(Empt): 250 μL Opti-MEM<sup>R</sup>。2)脂质体转染组(Lipo): 6 μg脂质体、250 μL Opti-MEM<sup>R</sup> 混合物。

3)质粒转染组(P): 2 μg pcDNA3.1(+)/GFP-TIMP-2、4 μg脂质体、250 μL Opti-MEM<sup>R</sup>。从接种AM组织块后第2天开始, 按上述实验分组设计施加处理因素, 每天3次, 连续滴注3 d。

1.2.3 测定移植瘤体积和瘤重 组织块接种后第5、9天用游标卡尺经皮测量肿瘤的最长径(A)、最短径(B), 按公式 $V=AB^2/2$ (V=肿瘤近似体积, A=瘤体的最长径, B=瘤体的最短径)计算肿瘤体积, 绘制生长曲线。以V5、V9分别表示第5天与第9天的肿瘤体积, DV表示第5天与第9天的体积差, 即 $DV=V5-V1$ 。天平称量移植瘤的瘤重, 以W表示。

1.2.4 移植瘤病理检查 10%甲醛固定, 石蜡包埋, 切片厚4 μm, 苏木精-伊红染色, 显微镜观察。0级: 瘤组织远离CAM或与CAM刚接触; 1级: 瘤组织穿透CAM不足1/2厚度; 2级: 瘤组织穿透CAM超过1/2, 但未穿透整个CAM; 3级: 瘤组织穿透整个CAM。

1.2.5 Western blot分析移植瘤MMP-2及TIMP-2蛋白的表达 按TRIZOL试剂说明书沉淀其中的DNA, 在沉淀DNA后的水相加入异丙醇沉淀蛋白质, 用盐酸胍乙醇溶液洗涤, 分离蛋白质蛋白上样、电泳、转膜、封闭、抗体孵育、曝光检测、印记分析及条带吸光度值检测等, 以空白组的MMP-2及TIMP-2的蛋白表达水平均值为参照, 取其他各组MMP-2及TIMP-2表达水平均值与空白组均值的比率作为统计分析用数据。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS 11.0统计软件包中独立样本t检验法和方差分析法对数据进行检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ ,  $P<0.05$ 表示有显著性差异。率的检验采用Fisher确切概率检验。

## 2 结果

### 2.1 移植瘤生长情况

瘤组织接种后开始呈弥散样位于接种区, 24 h后见瘤体附于鸡胚绒毛尿囊膜。第2天可见瘤中央区域绒毛尿囊膜透明度较周边明显变低, 但边界无扩展(图1)。第3天后瘤体直径逐渐增大, 但肿瘤厚度增加更为明显。第5天时有的肿瘤中央可见坏死灶, 至第7天肿瘤体积变大, 但主要呈团状生长, 明显变厚, 呈半球状, 肿瘤周围可见较为明显的环形水肿区, 肿瘤供血血管丰富, 见移植瘤呈淡红色, 四周与CAM边界较清晰, 表面轻度凹凸不平。肿瘤组织呈球形, 直径可达7 mm, 坏死灶常见。第9天后肿瘤增长缓慢(图2)。发育至第10天的鸡胚, 绒毛尿囊膜完全包裹鸡胚。



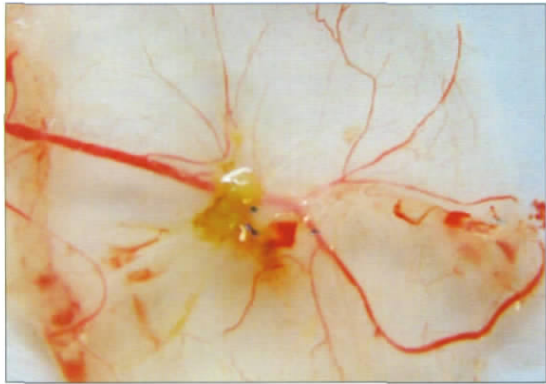


图 1 接种后第2天，移植瘤周血管较少  
Fig 1 2 days after grafting, there were less angiogenesis around the xenografts on CAM



图 2 接种后第9天，移植瘤周血管丰富  
Fig 2 9 days after grafting, there were more angiogenesis around the xenografts on CAM

2.2 移植瘤的体积和瘤重变化

移植瘤接种后第5天，和对照组相比，质粒转染组瘤体的体积质量均显著性减少，经*t*检验，差异有显著性( $P<0.05$ )。与空白对照组比较，质粒转染组移植瘤的生长速度在接种后第4天明显降低，此时是转染质粒的第3天。接种后第5天质粒转染组移植瘤的生长速度略有增加；自接种后第4天开始至第9天时，质粒转染组移植瘤的体积都小于对照组的体积。接种后第9天为实验终止时间。接种后第9天，质粒转染组移植瘤的质量比空白对照组明显减少( $P<0.05$ )。对照组和脂质体转染组的瘤重无显著性差异( $P>0.05$ )。经对转染后第5天和第1天的体积差进行统计分析，结果显示：质粒转染组和脂质体转染组的体积差均比对照组少，但转染质粒组和转染脂质体组无显著性差异。见表1。

表 1 移植瘤的体积及质量( $\bar{x}\pm s$ )

Tab 1 Volume and weight of xenografts( $\bar{x}\pm s$ )				
分组	V5/mm <sup>3</sup>	V9/mm <sup>3</sup>	DV/mm <sup>3</sup>	W/mg
Empt	2.476±0.241	9.332±0.364	7.314±0.143	23.183±0.341
Lipo	2.429±0.351	5.426±0.294	3.319±0.187	14.231±0.297
P	2.183±0.275	3.947±0.418	2.913±0.243	11.625±0.436

2.3 移植瘤病理及侵袭性生长情况分析

瘤组织为典型成釉细胞瘤表现，瘤细胞无核固缩、溶解、核分裂现象，瘤细胞存活。接种后第1天见瘤组织与CAM分界清晰，瘤体周围开始有新生血管形成，部分血管有出血现象。接种第3天见瘤组织与CAM黏附紧密，部分瘤细胞与之融合，融合细胞出现较多核分裂，胞体较大，有伪足伸展(图3)。接种后第5~7天瘤细胞与CAM有较多融合，可见瘤细胞穿透CAM。接种第9天CAM及瘤体均有萎缩(图4)。接种后第9天，对照组侵袭分级0级为2例、2级侵袭为8例、3级侵袭为2例。转染质粒组的侵袭分级0级为7例、2级侵袭为1例、3级侵袭为0例。Fisher确切概率检验显示，TIMP-2基因转染可以显著抑制成釉细胞CAM移植瘤的局部侵袭能力( $P<0.05$ )。

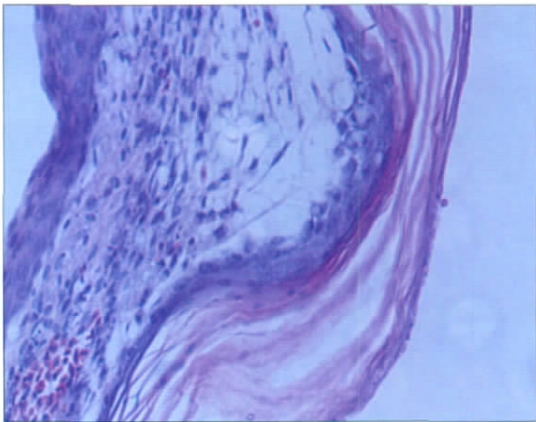


图 3 接种后第3天，移植瘤细胞向CAM生长但未突破(侵袭0级) HE ×200

Fig 3 3 days after grafting, xenograft cells were not penetrating CAM(Invading grade 0) HE ×200

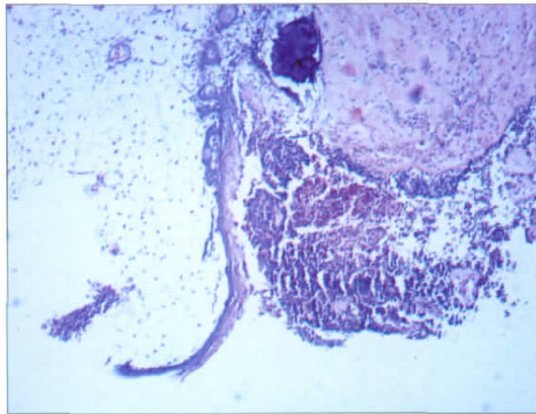


图 4 接种后第7天，移植瘤细胞突破CAM(侵袭3级) HE ×200

Fig 4 7 days after grafting, xenograft cells were penetrating CAM(Invading grade 3) HE ×200

2.4 Western blot分析结果

与空白对照组比较，空脂质体转染组的MMP-2蛋白表达平均值比率为0.78，经统计学分析，二者

之间无显著性差异( $P>0.05$ )；质粒转染组MMP-2表达平均值比率为0.29，MMP-2蛋白抑制率为45.38%。经统计学分析，质粒转染组MMP-2表达明显低于空白组MMP-2的表达( $P<0.05$ )。见图5。

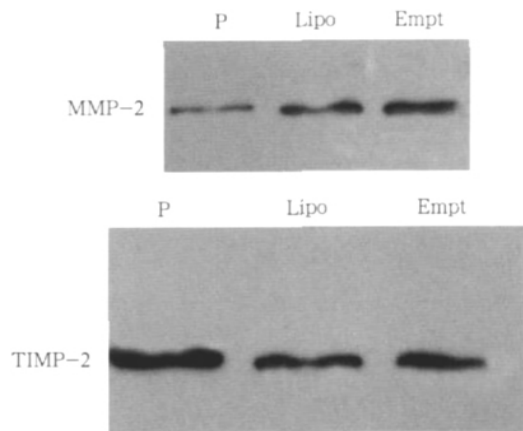


图5 Western blot分析各组MMP-2和TIMP-2蛋白的表达情况

Fig 5 The expression of MMP-2 and TIMP-2 proteins in different groups detected by Western blot

与空白组比较，空脂质体转染组的TIMP-2蛋白表达平均值比率为0.37，经统计学分析，二者之间无显著性差异( $P>0.05$ )；质粒转染组TIMP-2表达平均值比率为0.79，TIMP-2蛋白增加率为39.72% (图5)。

### 3 讨论

成釉细胞瘤虽然是良性牙源性肿瘤，但其生物学行为与其他良性肿瘤的膨胀性生长显著不同，常见侵袭性生长。目前，对AM侵袭性的研究主要在于AM自身的增殖活性及各种基因及蛋白的表达，尚缺少适宜的AM侵袭模型<sup>[2-3]</sup>。本实验以AM组织块接种法在CAM上，通过接种后不同时期的切片观测见AM可以在鸡胚CAM表面生长，在接种后第3天见有AM细胞与CAM融合，第6天可见有瘤细胞穿过CAM。提示，AM组织在CAM上可以保持其侵袭生长的特点，故成釉细胞瘤的CAM移植瘤模型可以作为AM侵袭研究的体内侵袭模型之一。CAM是天然免疫缺陷宿主，常作为移植性肿瘤的实验模型之一，也可作为肿瘤新生血管形成、肿瘤侵袭和远处脏器转移潜能的体内外实验。有许多优点<sup>[4]</sup>：1)操作方便、快捷，且价廉；2)它是一种天然的免疫缺陷宿主，可接受各种组织的移植；3)7~10 d龄鸡胚绒毛尿囊膜血管丰富，有利于肿瘤细胞的黏附、生长与侵袭，且便于直接观察；4)鸡胚可以耐受一定的温度变化，有利于检测某些对温度敏感的肿瘤细胞的生物学行为；5)CAM是天然的膜性屏障，可以很好的模拟基底膜在肿瘤侵袭中的作用。

肿瘤侵袭是指瘤细胞侵犯和破坏周围正常组织，也指瘤细胞在继发组织器官中定位生长。侵袭的主要过程有细胞的增殖和扩展；细胞的分离和脱落；细胞的定向运动和趋化；血管形成与侵袭等<sup>[5]</sup>。在肿瘤的侵袭过程涉及多个步骤，细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解是肿瘤侵袭性的标志，故以模拟人体基底膜的基本成分，含有Ⅰ型胶原、层粘连蛋白等组成的Matrigel胶的Boyden小室及Transwell小室等常用来做肿瘤侵袭的体外模型。多种动物和人体组织被用来研究癌细胞的侵袭机制。如人的胎盘、鼠的膀胱、鸡胚尿囊膜和牛的晶状体等<sup>[6-9]</sup>。本课题的前期研究<sup>[10]</sup>中，利用免疫缺陷动物如裸鼠等建立了人成釉细胞瘤的肾包膜下移植瘤模型。在预实验中本实验选用不同日龄的鸡胚进行试接种，经实验证实选用6 d龄的鸡胚进行癌细胞接种较为合适，因为日龄太小时胚胎还处于单珠期，胚胎的活动度较大，接种点常常会转动到其他位置，影响观察及实验效果，7~10 d龄时虽然鸡胚绒毛尿囊膜血管丰富，有利于肿瘤细胞的黏附、生长与侵袭，但由于AM生长相对较缓慢，故接种时间提前1 d。日龄太大时鸡胚在蛋壳内活动较大，绒毛尿囊膜也开始出现退化。本实验发现到接种第8~9天，肿瘤生长基本停滞，部分瘤体中央可见坏死，这是由于鸡胚成熟，CAM退化致瘤体血供减少所致。故在接种后第5~7天为观测AM侵袭的最佳时间。该模型可用于<sup>[11-12]</sup>：1)比较组织细胞的侵袭能力；2)分析用已知癌基因转染细胞的侵袭性；3)研究肿瘤侵袭机制。其特点是：1)简便、实用；2)模拟了体内器官及实体瘤的结构，使侵袭更直观，更接近体内侵袭实际情况。该模型的不足之处是，可供观察的时间过短，由于鸡胚的发育成熟，CAM逐渐退化使得移植瘤的生长受到限制。

通过对移植瘤生长测量观察分析，质粒转染组和对照组移植瘤的生长速度在接种后3 d内无明显的差别。质粒转染组移植瘤的生长速度于接种后第4天开始变慢，而对照组的生长速度则加快。实验组和对照组的差别仅仅在于有无pcDNA3.1(+)/GFP-TIMP-2表达质粒，因此，笔者认为实验组移植瘤生长速度的降低是由于TIMP-2的质粒转染作用引起的。对移植瘤的侵袭分级研究结果表明，质粒转染组的侵袭率与对照组比显著降低。经Western blot分析表明，质粒转染组移植瘤中TIMP-2蛋白的表达明显增加，而MMP-2蛋白表达量明显降低；对于这些情况，可能的原因是：pcDNA3.1(+)/GFP-TIMP-2表达质粒成功转染到AM细胞中，从而引起TIMP-2



7 d的存活率,而14 d时NGF组损伤侧舌下神经核内运动神经存活率与7 d相比未降低,提示NS组有正常神经元继续丢失而NGF组损伤侧神经元没有继续丢失。以上结果证明在舌下神经压榨损伤后,外源性NGF对神经元有保护作用。

再生神经成熟的指标包括形态学、电生理和功能恢复。本实验超薄切片电镜下观察损伤神经远端超微结构的形态学改变。结果显示舌下神经压榨损伤后7、14 d, NGF组损伤远端有髓神经纤维髓鞘形态、板层结构致密度、清晰度,轴突内细胞器结构,施万细胞形态均优于NS组。提示在舌下神经压榨损伤后,外源性NGF可促进神经的再生。

### [参考文献]

- [1] Schmalbruch H. Motoneuron death after sciatic nerve section in newborn rats[J]. J Comp Neurol, 1984, 224(2) 252-258.
- [2] Wang XJ, Kong KM, Qi WL, et al. Interleukin-1 beta induction of neuron apoptosis depends on p38 mitogen-activated protein kinase activity after spinal cord injury[J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26(8) 934-942.
- [3] Terayama R, Omura S, Fujisawa N, et al. Activation of microglia and p38 mitogen-activated protein kinase in the dorsal column

nucleus contributes to tactile allodynia following peripheral nerve injury[J]. Neuroscience, 2008, 153(4) :1245-1255.

- [4] Diolaiti D, Bernardoni R, Trazzi S, et al. Functional cooperation between TrkA and p75(NTR) accelerates neuronal differentiation by increased transcription of GAP-43 and p21(CIP/WAF) genes via ERK1/2 and AP-1 activities[J]. Exp Cell Res, 2007, 313(14) 2980-2992.
- [5] Santos SD, Verveer PJ, Bastiaens PL. Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate[J]. Nat Cell Biol, 2007, 9(3) 324-330.
- [6] Muroi Y, Ishii T, Teramoto K, et al. Calcineurin contributes to the enhancing effect of adenosine on nerve growth factor-induced neurite outgrowth via the decreased duration of p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation[J]. J Pharmacol Sci, 2004, 95(1) :124-131.
- [7] Marampon F, Casimiro MC, Fu M, et al. Nerve growth factor regulation of cyclin D1 in PC12 cells through a p21RAS extracellular signal-regulated kinase pathway requires cooperative interactions between Sp1 and nuclear factor-kappaB[J]. Mol Biol Cell, 2008, 19(6) 2566-2578.
- [8] Torcia M, De Chiara G, Nencioni L, et al. Nerve growth factor inhibits apoptosis in memory B lymphocytes via inactivation of p38 MAPK, prevention of Bcl-2 phosphorylation, and cytochrome c release[J]. J Biol Chem, 2001, 276(42) 39027-39036.

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第478页)

基因过表达, TIMP-2和MMP-2蛋白结合, MMP-2的活性被抑制, 导致AM细胞的生长受到不同程度的抑制。

### [参考文献]

- [1] 于世凤. 口腔组织病理学[M]. 5版. 北京: 人民卫生出版社, 2003 316-321.  
YU Shi-feng. Oral histology and pathology[M]. 5th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003 316-321.
- [2] Sandra F, Hendarmin L, Kukita T, et al. Ameloblastoma induces osteoclastogenesis: A possible role of ameloblastoma in expanding in the bone[J]. Oral Oncol, 2005, 41(6) 637-644.
- [3] Plasswilm L, Tannapfel A, Cordes N, et al. Hypoxia-induced tumour cell migration in an *in vivo* chicken model[J]. Pathobiology, 2000, 68(3) 99-105.
- [4] 蒋曦东. 鸡胚发育图谱[M]. 北京: 科学出版社, 1983 24-30.  
JIANG Xi-dong. Atlas of development of chicken embryo[M]. Beijing: Science Press, 1983 24-30.
- [5] 曾益新. 肿瘤学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2003 241-245.  
ZENG Yi-xin. Oncology[M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003 241-245.
- [6] Kumamoto H, Ohki K, Ooya K. Expression of p63 and p73 in ameloblastomas[J]. J Oral Pathol Med, 2005, 34(4) 220-226.

- [7] Jacquemier J, Mathoulin-Portier MP, Valtola R, et al. Prognosis of breast-carcinoma lymphagenesis evaluated by immunohistochemical investigation of vascular-endothelial-growth-factor receptor 3[J]. Int J Cancer, 2000, 89(1) 69-73.
- [8] Nakayama A, Ogawa A, Fukuta Y, et al. Relation between lymphatic vessel diameter and clinicopathologic parameters in squamous cell carcinomas of the oral region[J]. Cancer, 1999, 86(2) : 200-206.
- [9] Tanigawa N, Kanazawa T, Satomura K, et al. Experimental study on lymphatic vascular changes in the development of cancer[J]. Lymphology, 1981, 14(4) :149-154.
- [10] 张彬, 黄洪章, 陶谦, 等. 人成釉细胞瘤裸鼠移植瘤的建立及其生物学特性研究[J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2004, 2(4) 270-273.  
ZHANG Bin, HUANG Hong-zhang, TAO Qian, et al. Establishment and biological behavior of human ameloblastoma xenograft in nude mice[J]. Chin J Oral Maxillofac Surg, 2004, 2(4) 270-273.
- [11] Folkman J. Tumor angiogenesis and tissue factor[J]. Nat Med, 1996, 2(2) :167-168.
- [12] Papoutsis M, Siemeister G, Weindel K, et al. Active interaction of human A375 melanoma cells with the lymphatics *in vivo*[J]. Histochem Cell Biol, 2000, 114(5) 373-385.

(本文编辑 汤亚玲)