

肿瘤血管生成时浸润肥大细胞的观察

同济医科大学超微病理研究室 周晓军* 武忠弼

〔摘要〕本研究分别在S180生长不同时期定量地观察了浸润肥大细胞与血管生成的关系。在石蜡切片上以甲苯胺蓝和爱先蓝染色对肿瘤中的肥大细胞进行显示,并在电镜水平定量了肥大细胞胞浆颗粒的体密度及数目。同时还应用立体学测量技术在光镜水平对肿瘤血管进行了定量。结果显示:在肿瘤血管增生时常伴有肥大细胞数目的增加,肥大细胞颗粒数目减少,体密度降低,出现脱颗粒活动。这提示肿瘤中的肥大细胞可能促进肿瘤血管生成。

过去人们曾认为肿瘤中肥大细胞具有抑制肿瘤生长的作用^{〔1〕}。近年来许多事实表明:肥大细胞及其某些产物能诱发或促进肿瘤血管生成,从而间接地起着促进肿瘤生长、浸润的作用^{〔2〕}。也有报道表明,肥大细胞可直接刺激肿瘤生长或通过分解肿瘤间质成份来促进肿瘤的生长、浸润^{〔3、4〕}。为进一步确定肥大细胞同肿瘤血管生成的关系,有必要在肿瘤血管生长的不同时期于肿瘤原位定量地观察肥大细胞与肿瘤血管的关系,而目前尚缺乏这方面的资料。本研究选用移植性肿瘤,采用光镜,电镜定量观察技术,分别在肿瘤血管生长的不同时期对新生血管进行定量,同时对肿瘤中浸润的肥大细胞数目及其胞浆颗粒密度进行定量观察,试图通过分析肥大细胞与肿瘤血管生成的关系,探讨肿瘤组织中肥大细胞的生物学意义,更深入地了解肿瘤血管的发生机制。

材料和方法

1. 肿瘤移植:本实验所用动物为NIH纯种小鼠。选用S180移植瘤,按常规接种于小鼠右侧腋窝皮下,部分小鼠还在左侧腋窝皮下注射等量生理盐水,作为对照。带瘤小鼠被随机分为三组,每组动物5~6只,分别于接种后3天、6天、9天处死。

2. 光镜定量观察:动物处死后即剥离肿瘤,

称重,选取瘤周边组织3~4块,常规制成石蜡切片,厚4μm,行HE染色。参照Hilmas和Gillette的点计数法^{〔5〕},采用附带有映描装置的Leitz Orthoplan万能显微镜,在HE切片上对瘤组织中的微血管(包括毛细血管和部分小静脉)进行定量,分别测算出血管体积(Vv),血管表面积(SA),血管长度(VL),血管平均直径(d)等项参数。每例肿瘤观察3~4张切片。每例肿瘤观测时,落入瘤组织及血管中的总点数一般在2,000个左右。

3. 肥大细胞密度的测定:(1)取石蜡切片分别按Czaba与Graham等方法进行爱先蓝与甲苯胺蓝染色^{〔6、7〕};(2)分别观察两种染色切片,并记录各张切片上所有阳性细胞数目(X);(3)将切片上瘤组织图形适当放大后,以求积仪测量出每张切片上瘤组织面积(A),坏死组织除外;(4)按下式求得每例肿瘤中肥大细胞密度(D):

$$D = \frac{\sum X}{\sum A}$$

4. 电镜定量观察:取材后常规制作超薄切片,经醋酸铀、柠檬酸铅双重染色后,于OPTON EM10C透射电镜下观察。应用点计数法测试肥大细胞颗粒^{〔8〕},分别求得颗粒的体密度与面积密度。

5. 结果的统计分析:对肿瘤生长不同时期各组均数进行比较时应用单因素方差分析。首先比较各组均数间是否有显著性差异,再进行多组均数间的两两比较。对某些成对的两个参数进行相关系数的计算,并进行t检验。

结 果

*通讯地址:江苏南京军区总医院电镜室

小鼠接种肿瘤后第6天,第9天时肉眼均可见局部出现明显肿块。6天组瘤重380mg~910mg,9天组瘤重680mg~2,050mg。

对肿瘤生长不同时期中微血管的光镜形态进行比较,可以看出(见表1):随着肿瘤的生长,血管体积(Vv)、表面积(SA)、血管长度(VL)均趋于增加,而血管平均直径随之减小。

表1 S180生长不同时期肿瘤微血管形态变化

	V _v (%)	SA (mm ² /mm ³)	VL (mm/mm ³)	d (μm)
3天*	1.21±0.19	1.03±0.14	14.8±2.7	24.1±3.7
6天**	1.87±0.23	1.84±0.30	29.4±6.3	21.2±1.4
9天**	2.92±0.38	2.81±0.44	45.4±8.9	21.3±1.3
对照*	0.81±0.04	0.54±0.03	5.73±0.3	30.0±2.0
p***	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05

*n=4 **n=6 ***表中P值表示各组均数间差异的显著性。

表2、S180生长不同时期肥大细胞密度的变化(个/mm²)

染色方法	3天	6天	9天	对照	P
AB	1.4±0.5	1.7±0.3	4.1±0.5	0.8±0.2	<0.01
TO	0.3±0.04	1.6±0.3	2.5±0.5	0.4±0.1	<0.01
n	4	6	6	4	

表3、肥大细胞密度与其他指标的相关关系*

相关参数	6天	9天
m _A (个/mm ²) : TW (mg)	0	0
m _T (个/mm ²) : TW (mg)	0	0
m _A (个/mm ²) : m _T (个/mm ²)	+	+
m _A (个/mm ²) : V _v (%)	0	+
m _T (个/mm ²) : V _v (%)	0	+

*m_A: AB染色阳性细胞; m_T: TO染色阳性细胞; TW: 瘤重。

表4、肥大细胞颗粒密度变化

	3天	6天	9天	P
面数密度 (个/μm ²)	2.05±0.93	1.54±0.46	0.85±0.64	<0.01
体积密度 (%)	0.52±0.19	0.42±0.15	0.27±0.14	<0.01
n	21	29	26	

以爱先蓝(AB),甲苯胺蓝(TO)两种染色在光镜下显示肥大细胞,可见肥大细胞主要分布于瘤周,分布不均匀,常见肥大细胞位于小血管周围。定量观察结果显示(表2):肥大细胞密度随肿瘤生长而增高,以肿瘤生长第9天最显著。

相关关系分析表明(表3):无论6天组或9天组,两种染色显示的阳性细胞数之间有显著性的正相关关系(P<0.01)。两种阳性细胞密度均在9天组与血管体积呈显著性的正相关关系(P<0.01/0.05)。

电镜观察显示:肿瘤生长6天后,瘤组织周围出现较多的新生血管,并见毛细血管内皮细胞向周围组织伸出突起,表现出典型的游走形态。肥大细胞成群或散在分布于瘤周,可见于小血管或新生血管附近,或埋藏于胶原纤维之间,其周围结缔组织未见变性、崩解(图1)。肥大细胞胞浆内充满电子密度很高的颗粒,颗粒多呈圆形,内容物为物质细颗粒状。肿瘤生长初期肥大细胞颗粒丰富,较粗大,致密(图2),而在肿瘤生长第6天时颗粒数量减少,颗粒密度不均一,有的疏松、破碎,并见颗粒脱失于细胞外(图3),肿瘤生长第9天时细胞颗粒更为缺乏(图4)。定量结果表明(表4):随肿瘤的生长,肿瘤内肥大细胞颗粒数及体密度均有所减少。组间比较显示:9天组面数密度小于6天,3天组(P<0.01),6天组亦显著小于3天组(P<0.05);9天组体密度显著小于6天、3天组(P<0.01/0.05)。

讨 论

本观察表明,在肿瘤移植后第6天,第9天时肿瘤血管体积,长度显著增加,但血管平均直径减小,提示此时增多的血管主要为小口径的新生血管,同时,电镜下也观察到较多具有新生血管形态的血管。这些事实都证实在这两个时期中肿瘤内发生着较强的

血管增生反应。

正是在这一血管增生时期,我们观察到瘤组织中肥大细胞数量增多,胞浆颗粒脱失,并见肥大细胞数目与血管体积成正相关关系,肥大细胞的分布也常与小血管或新生血管相关。这就进一步表明肥大细胞具有促进血管生成的作用。

目前多数人认为⁽²⁾肥大细胞对血管生成的促进作用是通过肥大细胞颗粒中的肝素介导的,而肝素能在体外刺激内皮细胞的运动⁽⁹⁾我们的观察亦揭示:在瘤组织内肥大细胞增多并表现脱颗粒活动时,瘤组织血管增生,并见内皮细胞显著的游走运动形态。

据报道⁽⁴⁾,某些移植瘤中肥大细胞常见位于肿瘤与宿主组织交界区的结缔组织内,肥大细胞的脱颗粒常伴有周围结缔组织基质的断裂及溶解。还有人报道⁽¹⁰⁾,肥大细胞提取的可溶性产物能在体外刺激成纤维细胞或瘤细胞胶原酶的产生。这些作者提出,肿瘤中肥大细胞的存在同肿瘤的浸润转移有关。本观察虽然也常见肥大细胞位于瘤周围的结缔组织中,但未观察到其周围组织有明确的断裂和溶解。这提示至少在肿瘤生长早期阶段中,瘤组织中的肥大细胞并不主要同

促进肿瘤浸润、转移有关。

小 结

本研究分别在S180生长不同时期定量地观察了浸润肥大细胞与血管生成的关系。光镜与电镜定量观测结果显示:在肿瘤血管增生时常伴有肥大细胞数目的增加,肥大细胞颗粒数目减少,体密度降低,出现颗粒现象。这提示肿瘤中的肥大细胞与肿瘤血管生成有关。

(本文图见封四)

参 考 文 献

1. Fisher ER et al : Arch Path 79 : 185, 1965
2. Folkman J : Biochem Pharmacol 34 : 905, 1985⁶
3. Roche WR : Am J Pathol 119 : 57, 1985
4. Dabbons MK et al : Br J Cancer 54 : 459, 1986
5. Hilmas DE et al : Cancer 33 : 103, 1974
6. 刘介眉等:病理组织染色的理论,方法和应用, P189 人民卫生出版社, 1983.
7. Graham RM et al : Surg Gyn Obst 123 : 3, 1966
8. Sattar A et al : J Path 148 : 45, 1986
9. Azizkhan RG et al. J Exo Med 152 : 931, 1980
10. Pillarisetti V et al : J Immunol 130. 341, 1983

IN SITU QUANTITATIVE OBSERVATION ON INFILTRATION MAST CELLS DURING TUMOR ANGIOGENESIS

Zhou xiaojun et al.

Department of Ultrastructural Pathology, Tongji Medical University

The mast cells infiltrating in murine transplanted tumour, Sarcoma 180, were studied in situ quantitatively in varied times after tumour implantation for their relation with neovascularization of tumour. The Mast cells in tumour were identified in paraffin sections by toluidin blue stain and alcian blue stain, the number and the volumetric density of intracytoplasmic granules in mast cells were quantitated electron microscopically. Simultaneously the structure of new microvessels in tumours was quantitated in light microscopic by stereological morphometry level. The favourable effect of mast cells on tumour angiogenesis was manifested by the fact that the vascular proliferation in tumour was frequently associated with the addition of mast cells and electron microscopy revealed apparent degranulation with declining number and volumetric density of intracytoplasmic granules during tumor angiogenesis.

胃癌的组织发生及类型研究

——100例胃癌的粘液组织化学观察

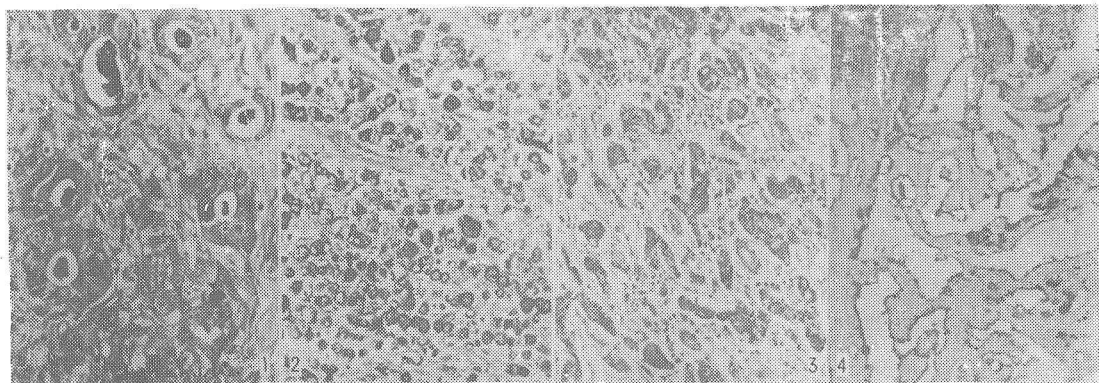


图 1: 胃型胃癌 (高分化腺癌)。肿瘤性腺腔内缘、腔内及癌细胞内均可见染紫红色的中性粘液物质。AB—PAS, $\times 66$

图 2: 肠型胃癌 (印戒细胞癌)。癌细胞内仅见染兰色的酸性粘液物质。AB—PAS, $\times 66$

图 3: 混合型胃癌 (低分化腺癌)。部分癌细胞内显示染紫红色的中性粘液物质 (浅色部分); 部分癌细胞内显示染兰色的酸性粘液物质 (深色部分)。AB—PAS, $\times 66$

图 4: 混合型胃癌 (高分化腺癌)。显示乳头表面的硫酸粘液及杯状细胞内的非硫酸的酸性粘液。AB—AF, $\times 66$

肿瘤血管生成时浸润肥大细胞的观察

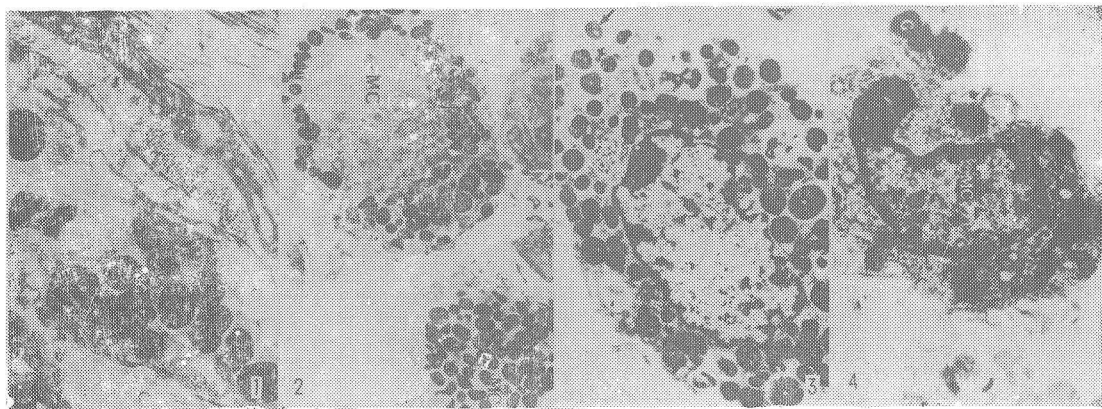


图 1: 肥大细胞 (MC) 埋藏于胶原纤维 (C) 之间, 周围结缔组织未见变性、崩解。EM $\times 13,400$

图 2: 肿瘤移植后 3 天。瘤组织中肥大细胞 (MC) 胞浆中充满颗粒, 颗粒粗大, 致密。EM $\times 6,300$

图 3: 肿瘤移植后 6 天。瘤组织中肥大细胞胞浆内部分颗粒疏松 (※), 破碎 (▲), 并见颗粒脱失于细胞外 (†)
EM $\times 8,000$

图 4: 肿瘤移植后 9 天。瘤内肥大细胞 (MC) 胞浆颗粒减少, 某些颗粒 (G) 移至细胞边缘, 趋于脱失。EM $\times 8,100$