

卵巢癌不易发生脑转移的机制探讨*

杜琴¹, 郑艺², 雷开健^{3△}, 贾钰铭³

(1. 山西省大同市第三人民医院肿瘤科 037006; 2. 遵义医学院附属医院产科, 贵州遵义 563000; 3. 四川省宜宾市第二人民医院肿瘤科 644000)

[摘要] **目的** 分析卵巢癌明显脑转移少见的可能机制。**方法** 将肺腺癌 A549 细胞株和卵巢癌 Skov3 细胞株分别通过尾静脉、腹腔、颈总动脉、颅内途径注入雌性裸鼠体内(每个途径 16 只裸鼠); 4~6 周后处死裸鼠, 取其脑、肺、肾、脾脏、肝脏、输卵管、卵巢及腹腔肿瘤包块, 进行 HE 染色, 分析脑内成瘤情况。**结果** 尾静脉注射途径 Skov3 细胞株组无脑转移, A549 细胞株组有 2 例脑转移; 腹腔注射途径 Skov3 细胞株组无脑转移, A549 细胞株组有 2 例脑转移; 颈总动脉注射途径 Skov3 细胞株组未发现脑内成瘤, A549 细胞株组 8 例脑内成瘤。以上 3 种颅外注射途径, Skov3 细胞株与 A549 细胞株在颅内成瘤率比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。而直接颅内注入途径 Skov3 细胞株组 14 例脑内成瘤, A549 细胞株组 10 例脑内成瘤, 二者比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 血脑屏障可能在阻止卵巢癌脑转移过程中起了重要作用。

[关键词] 卵巢肿瘤; 肺肿瘤; 脑转移; 裸鼠; 血脑屏障**[中图分类号]** R737.31**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)33-4619-03

Investigation on mechanism of ovarian cancer scarcely developing brain metastasis*

Du Qin¹, Zheng Yi², Lei Kaijian^{3△}, Jia Yuming³

(1. Department of Oncology, Datong Municipal Third People's Hospital, Datong, Shanxi 037008, China; 2. Department of Obstetrics, Affiliated Hospital, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China; 3. Department of Oncology, Yibin Municipal Second People's Hospital, Yibin, Sichuan 644000, China)

[Abstract] **Objective** To observe the intracranial tumorigenicity situation of lung cancer cell strain and ovarian cell strain by injecting them into the female nude mice with different approaches and to analyze the possible mechanism for scarce brain metastasis of ovarian cancer to provide a certain thinking for the treatment of brain metastasis of lung cancer. **Methods** Ovarian cancer cell strain Skov3 and lung cancer cell strain A549 were injected into female nude mice respectively through tail veins, abdominal cavity, common carotid artery and brain tissue. There were 16 nude mice in each approach. All the nude mice were killed 4-6 weeks later. Then the brain, lungs, kidneys, spleen, liver, fallopian tube, ovary and abdominal tumor mass were taken by HE staining for observing the cerebral tumorigenicity situation. **Results** By the caudal vein injection, there was no brain metastasis in the Skov3 strain group, while in the A549 strain group, 2 cases of brain metastasis occurred. By the abdominal cavity injection, there was no brain metastasis in the Skov3 strain group, but 2 cases of brain metastasis occurred in the A549 strain group. By the common carotid artery injection, there was no brain metastasis in the Skov3 strain group, but 8 cases of brain metastases occurred in the A549 group. The intracranial tumorigenicity of Skov3 strain and A549 strain had statistical difference among these 3 kinds of extracranial injection approaches ($P < 0.01$). By intracranial direct injection approach, 14 cases of brain tumorigenicity occurred in the Skov3 strain group, while 10 cases of brain tumorigenicity occurred in the A549 strain group, the difference had no statistical difference. **Conclusion** Blood brain barrier maybe plays an important role in preventing ovarian cancer cells from metastasizing into brain.

[Key words] ovarian neoplasms; lung neoplasms; brain metastasis; nude mice; blood brain barrier

卵巢癌是女性生殖系统恶性肿瘤之一, 5 年存活率低, 约 25%~30%。卵巢癌容易在腹腔广泛播散, 70% 的病例就诊时已属晚期。但卵巢癌极少发生脑转移, 尤其是上皮细胞性卵巢癌, 据相关报道卵巢癌脑转移的发生率为 0.29%~0.80%^[1-4]。而肺癌脑转移很常见, 约 20%~50%, 在脑转移瘤中来源于肺癌的占 18%~64%^[5]。为了探索卵巢癌脑转移少见的原因, 笔者将卵巢癌 Skov3 细胞株和肺腺癌 A549 细胞株通过不同途径注入裸鼠体内, 观察这两种细胞株在颅内成瘤的差异, 从而探讨卵巢癌不易发生脑转移的机制。

1 材料与与方法

1.1 材料 雌性 BALB/C 裸鼠, 6~8 周龄, 体重(18±2)g, 无特定病原体级 (SPF), 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 饲养于 SPF 动物房。肺腺癌 A549 细胞株及卵巢癌 Skov3 细胞株, 购自北京金紫晶生物医药技术有限公司。

公司, 饲养于 SPF 动物房。肺腺癌 A549 细胞株及卵巢癌 Skov3 细胞株, 购自北京金紫晶生物医药技术有限公司。

1.2 主要试剂 RPMI1640 培养液、灭活新生牛血清、胰酶购自 Hycone 生物制品公司; PBS 液购自贵阳爱瑞生物有限公司; 氯化钠购自上海试剂总厂; 水合氯醛购自国药集团化学试剂有限公司; 甲醛溶液购自重庆市北碚精细化工厂。

1.3 主要仪器 SHZ-88A 往复式水浴恒温振荡器购自江苏太仓市实验设备厂; Centrifuge5415D 离心机购自德国 Eppendorf 公司; 低温冰箱 MDF-38ZE 购自 Sanyo 公司; Nikon 光学显微镜购自尼康仪器有限公司; BP211D 精密电子天平购自北京赛多利斯电子有限公司; CO₂ 孵箱购自 Thermo Scientific 公司; TMS-1015 倒置显微镜购自 Olympus 公司。

1.4 细胞培养及制备 肺腺癌 A549 细胞株及卵巢癌 Skov3 细胞株用 RPMI1640 培养液培养(含 10% 新生牛血清),当细胞达到 80%~90% 融合时进行消化。最后以 0.9% 氯化钠注射液稀释至细胞密度为 1×10^7 /mL 和 3×10^7 /mL 两种单细胞悬液,备用。

1.5 接种方法 接种动物按以下途径分别接种肺腺癌 A549 细胞株和卵巢癌 Skov3 细胞株,每种细胞每个途径各接种 16 只裸鼠。(1)尾静脉途径:裸鼠尾部皮肤用 75% 乙醇常规消毒,将制备好的 0.15 mL 肿瘤细胞悬液(浓度为 1×10^7 /mL)注入裸鼠尾静脉,共注入 1.5×10^6 个肿瘤细胞。(2)腹腔途径:裸鼠腹部皮肤用聚维酮碘消毒,将制备好的 0.15 mL 肿瘤细胞悬液(浓度为 1×10^7 /mL)注入裸鼠左侧腹腔。(3)颈总动脉途径:用 2% 水合氯醛(麻醉剂量标准:200 mL/kg)腹腔注射麻醉裸鼠(麻醉后观察裸鼠呼吸、心率稳定,无大小便失禁),以仰卧位将已麻醉的裸鼠固定于实验木板上,用聚维酮碘消毒裸鼠颈部皮肤,剪开皮肤,钝性逐层分离皮下组织,暴露右侧颈总动脉,用 0 号丝线标记颈总动脉近心端并结扎,远心端用动脉夹(3 mm 型号)夹闭,用眼科剪刀在两端封闭的这一段颈总动脉动脉壁剪开一个小斜口,再用 PE 导管插入颈总动脉斜口,取掉远心端动脉夹,继续插入 1 cm,沿导管注入 0.05 mL 肿瘤细胞悬液(浓度为 3×10^7 /mL),用 0 号丝线将注射处远端结扎,以防细胞回漏。聚维酮碘常规消毒手术切口后立即缝合皮肤。术后裸鼠保温,待裸鼠苏醒后放入笼中继续饲养。(4)颅内途径:裸鼠麻醉同上,俯卧位固定于实验木板上,参照 Kast-ritis 等^[6]的方法进行颅内注射:用聚维酮碘消毒裸鼠头部皮肤,在裸鼠头顶正中切开长约 0.5 cm 皮肤,暴露颅骨,在前凶前 0.5 mm、中线右侧 2.0 mm 处为进针点。用 1 mL 注射器抽吸 3×10^7 /mL 的单细胞悬液 0.05 mL(含有 1.5×10^6 个肿瘤细胞),用适当力度注入颅内,进针深度约为 3 mm,消毒棉球压迫止血数分钟,缝合切口。术后裸鼠保温,待裸鼠苏醒后放入笼中继续饲养。有研究报道^[7-8]。将 NCI-H460 细胞接种在裸鼠肺叶中,4 周后发现脑转移、骨转移及肾上腺转移。本实验继续饲养裸鼠 4~6 周后,部分裸鼠行动迟缓,进食减少,出现呼吸急促,消瘦,腹部增大,腹部可扪及包块。用颈椎脱臼法处死裸鼠,系统解剖探查,取脑、肺、肾脏、脾脏、肝脏、双侧输卵管、卵巢及腹腔肿瘤包块,10% 中性甲醛固定,石蜡包埋,HE 染色。所有病理切片均由同一位具有高级职称的病理专家阅片确认。

1.6 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行统计分析。计数资料用率或构成比表示,各率或构成比的比较用 χ^2 检验;因为 $n < 40$, $T < 1$,用四格表的 Fisher 确切概率法统计,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 尾静途径成瘤或转移情况 见表 1,两种细胞株颅内转移比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 裸鼠尾静脉注射 Skov3 细胞和 A549 细胞脑转移比较(n)

组别	动物数	脑转移	肺内成瘤
Skov3 细胞	16	0	6
A549 细胞	16	2	10

2.2 腹腔注射途径成瘤或转移情况 腹腔肿瘤大体外观呈球形,直径约 1 mm 至 2 cm 大小不等,白色,质硬,表面凹凸不平,与腹壁及腹腔周围器官有粘连,将肿瘤切开后,内部实质色

白,无液腔及坏死区域。肺脏、膈肌、肝脏、胰脏、胃、脾脏、卵巢、输卵管、子宫等表面均可见到结节。其成瘤或转移情况见表 2,两种细胞株颅内转移比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 裸鼠腹腔注射 Skov3 细胞和 A549 细胞脑转移比较(n)

组别	动物数	脑转移	肺转移	腹腔及腹腔脏器成瘤
Skov3 细胞	16	0	0	4
A549 细胞	16	2	6	14

2.3 右颈总动脉注射途径 由于右侧总动脉被结扎,个别裸鼠出现同一方向转圈运动及一侧眼睑闭合现象,可能是因为右侧大脑缺血及损伤右侧迷走神经引起。成瘤或转移情况,见表 3,两种细胞株颅内转移比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 3 裸鼠颈总动脉注射 Skov3 细胞和 A549 细胞脑转移比较(n)

组别	动物数	脑转移	肺转移
Skov3 细胞	16	0	0
A549 细胞	16	8	0

2.4 前 3 种途径裸鼠颅内转移总体情况 见表 4,两种细胞株颅内转移比较差异有统计学意义($\chi^2 = 19.200$, $P < 0.01$)。

表 4 前 3 种途径注射 Skov3 细胞和 A549 细胞脑转移总体比较(n)

组别	动物数	脑内成瘤	肺转移
Skov3 细胞	48	0	6
A549 细胞	48	12	16

2.5 裸鼠颅内直接注射途径 Skov3 细胞和 A549 细胞脑内成瘤率都很高,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 5。

表 5 裸鼠颅内注射 Skov3 细胞和 A549 细胞脑内成瘤情况比较(n)

组别	动物数	脑内成瘤	肺转移
Skov3 细胞	16	14	4
A549 细胞	16	10	6

3 讨 论

卵巢癌起病隐匿,腹腔内转移率高,复发率高,预后差,在女性生殖系统恶性肿瘤中的病死率居高位^[9]。但上皮性卵巢癌发生脑转移的极少见^[10],而非小细胞肺癌脑转移很常见。笔者假设卵巢癌 Skov3 细胞株在裸鼠体内和在人体内一样,脑转移也很少。为此,通过不同途径将这两种细胞株注入裸鼠体内,或许对探索卵巢癌不易脑转移的机制有一定启示。从动物实验结果分析,尾静脉注射途径、腹腔注射途径、颈总动脉注射途径都在裸鼠体内不同部位形成一定的肿瘤灶,虽然 Skov3 细胞株形成肿瘤灶的比率相对较少,但卵巢癌 Skov3 细胞株未发现 1 例在脑内成瘤,这应该不是偶然现象。笔者可以据此推断,血脑屏障在阻挡卵巢癌 Skov3 细胞进入脑组织的过程中起了重要作用。而直接注入脑组织的两种肿瘤细胞成瘤率都很高,说明裸鼠脑组织环境并不能抑制肺癌 A549 细胞和卵巢癌 Skov3 细胞的生长。裸鼠颈总动脉注射途径,卵巢癌 Skov3 细胞株未发现颅内成瘤,而肺腺癌 A549 细胞株颅内成瘤率达到

50%，这一点与临床肺癌易发生脑转移相符，而卵巢癌细胞为什么不容易通过血脑屏障，目前还不清楚。尾静脉注射途径与腹腔注射途径颅内转移差异无统计学意义，可能是样本量不够；同时也提示，采用这两种途径循环肿瘤细胞数量不是那么多，因而肺癌细胞进入大脑的可能性也低。

血脑屏障是机体最重要的内部屏障之一，由脑毛细血管内皮细胞、基膜和胶质细胞足突共同组成^[11]。血脑屏障的结构包括：毛细血管内皮细胞之间的紧密连接、毛细血管基膜、由星形胶质细胞终足围绕形成的毛细血管基膜外的胶质膜^[12]。血脑屏障是维持脑内环境稳定的重要结构，它允许脑组织所需要的营养物质通过的同时而可有效阻挡有害物质的侵入^[13]。由于脑毛细血管内皮的屏障功能，蛋白质、大分子药物以及各种染料不易透过血脑屏障；脑毛细血管内皮细胞间的紧密接合含有带负电荷的胶质，故带负电荷的物质不易通过血脑屏障^[14]。是否卵巢癌 Skov3 细胞株整体带负电荷的分子多，从而被血脑屏障排斥在外，是笔者下一步研究的方向。腹腔注射途径，卵巢癌 Skov3 细胞株未发现肺内转移，可能是由于腹膜屏障也会在一定程度上阻挡 Skov3 细胞向腹腔外侵犯。

综上所述，一旦血脑屏障在某些因素影响下被破坏，卵巢癌脑转移的概率则大大增加。卵巢癌患者保持血脑屏障的完整性，对于减少卵巢癌脑转移起到非常重要的作用。至于卵巢癌细胞不容易通过血脑屏障，是其电荷屏障作用还是相关分子作用，有待于今后进一步探讨。

参考文献

- [1] Mayer RJ, Berkow IR, Griffiths CT. Central nervous system involvement by ovarian carcinoma[J]. *Cancer*, 1978, 41(2):776-783.
- [2] Larson DM, Copeland LJ, Moser RP, et al. Central nervous system metastases in epithelial ovarian carcinoma [J]. *Obstet Gynecol*, 1986, 68(6):746-750.
- [3] Ross WM, Carmichael JA, Shelley WE. Advanced carcinoma of the ovary with central nervous system relapse[J]. *Gynecol Oncol*, 1988, 30(3):398-406.
- [4] Hardy JR, Harvey VJ. Cerebral metastases in patients

with ovarian cancer treated with chemotherapy[J]. *Gynecol Oncol*, 1989, 33(3):296-300.

- [5] Tasdemiroglu E, Kaya AH, Bek S, et al. Neurologic complications of cancer. part1: Central Nervous System Metastasis[J]. *Neurosurg Q*, 2004, 14(2):71.
- [6] Kastritis E, Efstathiou E, Gika D, et al. Brain metastases as isolated site of relapse in patients with epithelial ovarian cancer previously treated with platinum and paclitaxel-based chemotherapy[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2006, 16(3):994-999.
- [7] 李如军, 刁艺, 黄强, 等. 可移植性人脑胶质瘤组织裸小鼠脑内移植及其 MR 显像研究[J]. *癌症*, 2007, 26(9):937-941.
- [8] Johnston MR, Mullen JB, Pagura ME, et al. Validation of an orthotopic model of human lung cancer with regional and systemic metastases[J]. *Ann Thorac Surg*, 2001, 71(4):1120-1125.
- [9] Howard RB, Mullen JB, Pagura ME, et al. Characterization of a highly metastatic, orthotopic lung cancer model in the nude rat[J]. *Clin Exp Metastasis*, 1999, 17(2):157-162.
- [10] Cho KR. Ovarian cancer update: lessons from morphology, molecules, and mice[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2009, 133(11):1775-1781.
- [11] 张蓉, 刘丽影. 卵巢上皮细胞癌脑转移 3 例报道及文献复习[J]. *医学科研通讯*, 1994, 23(1):28.
- [12] 成令忠. 组织学与胚胎学[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社, 1996:101-105.
- [13] 吴旭东, 曹小定. 血脑屏障与脑缺血[J]. *国外脑血管病杂志*, 2000, 8(5):272-275.
- [14] 桑洁, 刘萍, 赵宝全. 血脑屏障分子组成研究进展[J]. *国际药理学研究杂志*, 2011, 38(3):201-205.

(收稿日期:2016-02-18 修回日期:2016-06-06)

(上接第 4618 页)

- 2009, 125(6):1343-1351.
- [7] McSherry EA, Brennan K, Hudson L, et al. Breast cancer cell migration is regulated through junctional adhesion molecule-A-mediated activation of Rap1 GTPase [J]. *BCR*, 2011, 13(2):R31.
- [8] Severson EA, Lee WY, Capaldo CT, et al. Junctional adhesion molecule A interacts with Afadin and PDZ-GEF2 to activate Rap1A, regulate beta1 integrin levels, and enhance cell migration[J]. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(7):1916-1925.
- [9] Brennan K, McSherry EA, Hudson L, et al. Junctional adhesion molecule-A is co-expressed with HER2 in breast tumors and acts as a novel regulator of HER2 protein degradation and signaling[J]. *Oncogene*, 2013, 32(22):2799-2804.
- [10] Nava P, Capaldo CT, Koch S, et al. JAM-A regulates epi-

thelial proliferation through Akt/beta-catenin signalling [J]. *EMBO Rep*, 2011, 12(4):314-320.

- [11] Kooistra MR, Dube N, Bos JL. Rap1: a key regulator in cell-cell junction formation[J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 1):17-22.
- [12] 肖高春, 童仕伦, 郑勇斌, 等. PI3K/AKT 及 MEK/ERK 信号通路在肿瘤血管内皮细胞迁移中的作用[J]. *重庆医学*, 2015, 44(11):1452-1456.
- [13] Fang J, Zhou SH, Fan J, et al. Roles of glucose transporter-1 and the phosphatidylinositol 3kinase/protein kinase B pathway in cancer radioresistance(review)[J]. *Mole Med Rep*, 2015, 11(3):1573-1581.
- [14] Kortholt A, Bolourani P, Rehmann H, et al. A Rap/phosphatidylinositol 3-kinase pathway controls pseudopod formation [J]. *Mol Biol Cell*, 2010, 21(6):936-945.

(收稿日期:2016-03-28 修回日期:2016-05-12)