

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.12.014

喉癌组织中类高内皮微静脉形态学及蛋白多糖表达的研究*

王春英¹ 黄小义² 刘颖² 郭连军² 贾立敏^{2△} 贺业春²

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院耳鼻喉科 黑龙江 哈尔滨 150001; 2 哈尔滨医科大学人体解剖学教研室 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要 目的:通过对喉癌组织中类高内皮微静脉的分布、超微结构和蛋白多糖表达的观察,探讨淋巴细胞归巢的抗肿瘤意义及蛋白多糖对淋巴细胞归巢的调节作用。**方法:**应用透射电镜及阳性胶体铁染色方法,观察和研究 32 例喉癌组织中的类高内皮微静脉的分布、超微结构和蛋白多糖的表达。**结果:**(1) 早期病变肿瘤周边组织内可见大量类高内皮微静脉,其内皮细胞高大,胞浆突起增多,细胞核大,细胞器丰富,有大量淋巴细胞穿越管壁,可见大量肿瘤浸润淋巴细胞存在;晚期病变组织内类高内皮微静脉少见,淋巴细胞穿越管壁不活跃,肿瘤浸润淋巴细胞明显减少。(2) 类高内皮微静脉壁,特别是邻近管腔侧与阳性胶体铁呈强阳性反应,在有淋巴细胞穿越的部位反应更加明显,而内皮扁平的血管基本不反应或反应微弱。**结论:**(1) 喉癌组织中部分毛细血管后微静脉可演变为类高内皮微静脉,是淋巴细胞向癌组织中浸润(淋巴细胞归巢)的重要场所;(2) 肿瘤组织中的淋巴细胞归巢与抗肿瘤密切相关;(3) 蛋白多糖于淋巴细胞归巢旺盛的类高内皮微静脉呈强表达,可能对归巢淋巴细胞穿越类高内皮微静脉有调节作用。

关键词:喉癌;类高内皮微静脉;超微结构;蛋白多糖

中图分类号:R739.65 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)12-2259-04

Study on the Morphology of High Endothelium Venule-like Blood Vessels and Expression of Proteoglycan in Laryngeal Carcinoma*

WANG Chun-ying¹, HUANG Xiao-yi², LIU Ying², GUO Lian-jun², JIA Li-min^{2△}, HE Ye-chun^{2△}

(1 Otolaryngology department of the fourth affiliated hospital of Harbin medical university, Harbin, Heilongjiang Province, 150001, China; 2 Anatomy department of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang Province, 150081, China)

ABSTRACT Objective: To observe the distribution and ultrastructure of high endothelium venule-like blood vessels in human laryngeal carcinoma and expression of proteoglycan and to inquire regulatory role of proteoglycans and the anticancer significance of lymphocyte homing. **Methods:** The distribution and ultrastructure of high endothelium venule-like blood vessels and expression of proteoglycan were studied by cationic colloid iron staining and electron microscopy in thirty-two human laryngeal carcinoma. **Results:** (1) Beside the laryngeal carcinoma, there were a lot of high endothelium venule-like blood vessels. Their endothelium became high. The organelles in endothelium were abundant, many cytoplasm projects were found on the endothelium surface. The nucleus was big. There were a large number of lymphocytes traverse through the wall of the high endothelium venule-like blood vessels. A large number of tumor infiltrating lymphocytes could be found in the laryngeal carcinoma tissue. High endothelial vein-like blood vessels were rarely observed in the latter stage of laryngeal carcinoma. Lymphocytes were not actively cross the wall of the high endothelium venule-like blood vessels, tumor infiltrating lymphocytes decreased significantly. (2) The wall of high endothelium venule-like blood vessels, especially the side next to the lumen of the vessels, was strongly positive staining. The parts with the lymphocytes traversing endothelium were stained stronger. The vessels with flat endothelium were negative staining. **Conclusions:** (1) Postcapillary venules can turn into high endothelium venule-like blood vessels in laryngeal carcinoma. They were the important site of lymphocyte homing. (2) The lymphocyte homing in laryngeal carcinoma had a closed relationship with their anticancer role. (3) Expression of proteoglycan were very strong in high endothelium venule-like blood vessels where the lymphocyte homing were active. Proteoglycan maybe regulate the homing of the tumor infiltrating lymphocyte.

Key words: Laryngeal carcinoma; High endothelium venule-like blood vessels; Ultrastructure; Proteoglycan

Chinese Library Classification(CLC): R739.65 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)12-2259-04

前言

淋巴细胞再循环是指外周淋巴器官的淋巴细胞经毛细血

管后微静脉进入淋巴循环,以利于免疫细胞接触外来抗原,从而发挥免疫防御和免疫监视功能,然后再回流至血循环。此过程也被称为淋巴细胞归巢(homing),是机体产生免疫应答的前

* 基金项目:黑龙江省卫生厅科研课题基础医学研究项目(2010-119);黑龙江省科技厅青年科学基金项目(QC06C063)

作者简介:王春英(1965-),女,硕士,副主任医师,主要研究方向:喉癌基础的研究,E-mail:chunying0218@sina.com

△通讯作者:贾立敏,E-mail:jlm_176@sina.com

(收稿日期:2013-11-11 接受日期:2013-12-10)

提和关键^[1]。高内皮微静脉(high endothelial venules, HEVs)是存在于除脾以外几乎所有的周围淋巴器官和淋巴组织中的特殊的毛细血管后微静脉,是淋巴细胞自血液进入淋巴组织的通道,是淋巴细胞归巢的重要场所。近来有研究表明,在非淋巴组织慢性炎症和肿瘤等情况下,也可见到 HEV 样血管,即有些血管的内皮由扁平变为立方形或圆柱形,此类血管被称为类高内皮微静脉,现被认为与淋巴细胞进入这些部位的募集作用有关^[2,3]。蛋白多糖(proteoglycan, PG)是蛋白质与多糖以共价和非共价键相连构成的巨大分子,是细胞外基质的重要组成成分之一,普遍存在于组织间隙、细胞表面、基膜等处,在保持结缔组织水分及与组织间物质交换、调节细胞外液中阳离子在组织中的分布、润滑、保护关节软骨、创伤的愈合、免疫细胞归巢、炎症、肿瘤的发生和发展等方面起着重要的作用^[4]。有研究报道 PG 可能通过增强趋化因子的作用参与淋巴细胞归巢的调节,但目前对其还缺乏系统、深入的认识^[5],尤其是对 PG 在类高内皮微静脉上的表达、分布以及调节作用的研究知之甚少。

本研究应用光镜和透射电镜观察人喉癌组织中的类高内皮微静脉的分布、超微结构和蛋白多糖的表达情况,探讨淋巴细胞穿越类高内皮微静脉的形态学表现以及蛋白多糖在淋巴细胞归巢中的调节作用,旨在为研究肿瘤的淋巴细胞定向归巢途径和调控以及肿瘤的免疫治疗提供实验支持和理论依据。

1 材料与方法

1.1 组织标本

手术切除的人喉癌组织标本 32 例,由哈尔滨医科大学附属第四医院提供,经临床及病理科显微镜下诊断后分为早期和晚期病变两组。

1.2 石蜡样品制备

将术中所取的新鲜喉癌组织标本用生理盐水冲洗后放入 4% 多聚甲醛固定,常规梯度酒精脱水、二甲苯透明后石蜡包埋。

1.3 阳性胶体铁染色

常规二甲苯脱蜡、梯度酒精入水后,胶体铁工作液(pH=1.5)染色 30-50 分钟,蒸馏水水洗;亚铁氰化钾、盐酸发色 10 分钟,蒸馏水水洗;核固红复染 1 分钟,蒸馏水水洗,酒精脱水、二甲苯透明,树脂封片,显微镜观察并照相。

1.4 透射电镜样品制备

生理盐水冲洗新鲜的喉癌组织标本,细切后放入 2.5% 戊二醛中固定 24 h,磷酸缓冲液冲洗,1% 锇酸复固定 2 h,EPON812 包埋、超薄切片、醋酸铀、柠檬酸铅双重染色后,日立 JEM-200 透射电镜观察并照相。

2 结果

2.1 类高内皮微静脉的分布与形态

2.1.1 早期病变 光镜下可见类高内皮微静脉主要位于肿瘤周边淋巴细胞积聚的部位(图 1),肿瘤组织内有较多散在的浸润淋巴细胞,肿瘤组织周边也可见大量的淋巴细胞聚集。透射电镜下可见位于肿瘤周边的类高内皮微静脉内皮高大,突向管腔,细胞表面小突起增多,细胞核大,有的出现切迹,异染色质边集,细胞器丰富,可见大量的线粒体、游离核糖体和丰富的粗

面内质网。内皮细胞内有淋巴细胞穿越,管腔内、外可见大量淋巴细胞(图 2)。

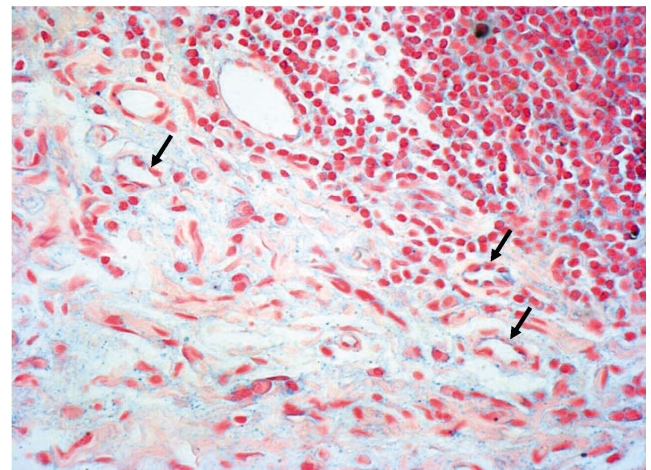


图 1 喉癌早期病变组织中呈强阳性普鲁士兰着色的类高内皮微静脉位于肿瘤周边部位↑:类高内皮微静脉阳性胶体铁染色(× 100)

Fig.1 High endothelium venule-like blood vessels with strong positive Prussian blue staining located mainly in the surrounding parts of carcinoma in the early laryngeal carcinoma lesions. ↑: high endothelium venule-like blood vessels Cationic colloid iron staining (× 100)



图 2 喉癌早期病变组织中的类高内皮微静脉内皮高大,突向管腔,可见大量的线粒体、游离核糖体和丰富的粗面内质网。管腔内、外可见大量淋巴细胞存在。↑:类高内皮微静脉内皮 \(\downarrow\):淋巴细胞 透射电镜(× 1700)

Fig.2 The endothelium of the high endothelium venule-like blood vessels in the laryngeal carcinoma tissue was high. A number of mitochondria, free ribosomes and rough endoplasmic reticulum could be found. There were a large number of lymphocytes inside and outside the high endothelium venule-like blood vessels. ↑: endothelium of the high endothelium venule-like blood vessel \(\downarrow\): lymphocytes TEM (× 1700)

2.1.2 晚期病变 光镜下喉癌晚期肿瘤组织内新生血管明显增多,少见类高内皮微静脉(图 3),浸润淋巴细胞明显减少。类高内皮微静脉的内皮细胞虽高大,但内皮的形态结构发生了变

化。细胞核不规则,可见大量切迹,异染色质较多且不均匀地分布于核周缘或呈块状散在于常染色质中(图4)。线粒体多出现肿胀,嵴减少、紊乱,甚至出现囊泡变,高尔基复合体不发达,基膜不连续(图5)。类高内皮微静脉内皮内少见淋巴细胞穿越,管腔内、外的淋巴细胞也较少。

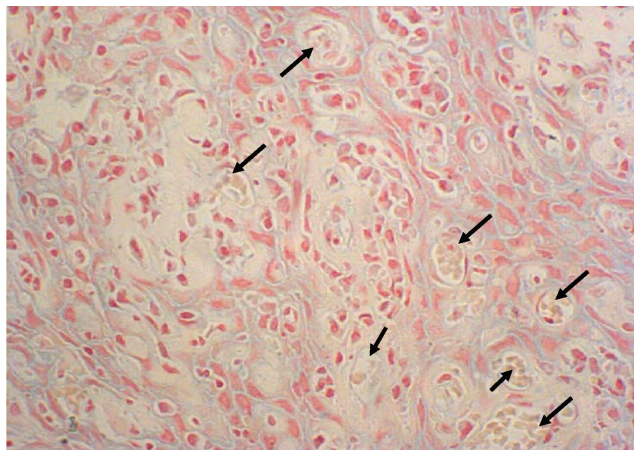


图3 喉癌晚期病变组织内新生血管明显增多,类高内皮微静脉少见↑: 新生血管 阳性胶体铁染色(× 100)

Fig.3 Newborn blood vessels increased obviously and high endothlium venule-like blood vessels were observed rarely in the late Laryngeal carcinoma lesions. ↑ :newborn blood vessels Cationic colloid iron staining (× 100)

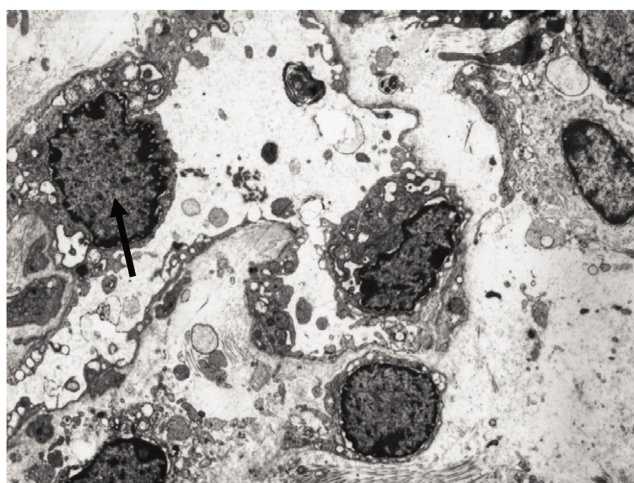


图4 喉癌晚期病变类高内皮微静脉内皮细胞核出现大量切迹,异染色质浓缩且不均匀地分布于核周缘或呈块状散在于常染色质中。↑ :内皮细胞核 透射电镜(× 2550)

Fig.4 The endothelial nucleus of high endothlium venule-like blood vessels appeared a large number of incisure in the late laryngeal carcinoma tissue. The heterochromatin was not evenly distributed in the peripheral of the nucleus or scattered among the euchromatin. ↑ :endothelial nucleus TEM(× 2550)

2.2 蛋白多糖的分布及表达

经阳性胶体铁溶液孵育后,与阳性胶体铁反应的阴性电荷部位呈普鲁士兰着色。经核固红核对比染色的淋巴细胞核呈红色,类高内皮微静脉的内皮细胞核呈淡的红蓝相间或灰蓝色。

早期病变组织内类高内皮微静脉壁的内皮细胞的细胞膜,

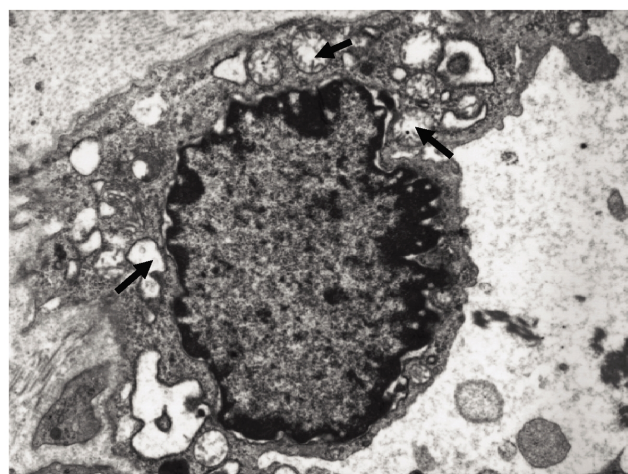


图5 喉癌晚期病变组织内类高内皮微静脉内皮线粒体出现肿胀,甚至囊泡变。↑ :线粒体 透射电镜(× 9000)

Fig.5 The mitochondria of the high endothlium venule-like blood vessels in the laryngeal carcinoma tissue swelled, even appeared vesicle-like changes. ↑ :mitochondria TEM (× 9000)

特别是邻近管腔侧呈强阳性普鲁士兰着色,内皮扁平的血管内皮细胞与阳性胶体铁无明显反应(图1)。

晚期病变组织内类高内皮微静脉少见且普鲁士兰着色较浅。

3 讨论

3.1 类高内皮微静脉

研究报道在非淋巴组织慢性炎症和肿瘤等情况下,扁平的毛细血管后微静脉会发生高内皮静脉样的变化,即具有类似高内皮静脉的形态特征以及与其一致的特征性标志因子表达^[2,3]。在病理状态下,毛细血管后微静脉发生此种类高内皮静脉样变化的机制尚不清楚,有研究认为是经抗原激活的巨噬细胞的刺激下引起的血管内皮细胞活化^[6],也有研究认为是炎症细胞因子的刺激引起的^[7],或者是机体的局部免疫反应的结果^[8]。

本试验对32例喉癌组织的观察发现,在病变早期癌周区淋巴细胞浸润的部位可见大量类高内皮微静脉,其内皮高大,突向管腔,胞质突起增多,细胞核大,含有大量的线粒体、丰富的粗面内质网和游离核糖体。细胞中线粒体的具体数目取决于细胞的代谢水平,代谢活动越旺盛,线粒体越多;而粗面内质网是膜蛋白和分泌蛋白的主要合成场所。早期病变时内皮的这些细胞器变化说明在病变早期类高内皮细胞的蛋白质合成及代谢活动都非常活跃。此外,在类高内皮微静脉的管腔内、外和管壁中可见有大量淋巴细胞存在,因此推断病变早期的内皮细胞功能活跃,淋巴细胞归巢能力相应较强。此外,我们观察到在肿瘤组织及癌周区淋巴细胞也有大量浸润,也证明了这一点。

在喉癌病变晚期组织内虽然也可见到类高内皮微静脉,但数量明显减少,而且类高内皮微静脉内皮细胞的异染色质不均匀地分布于核周缘或呈块状散在于常染色质中,说明病变晚期的类高内皮微静脉内皮细胞转录功能低下。此外,类高内皮微静脉内皮细胞核变得不规则,出现大量切迹,线粒体多出现肿胀、嵴减少、紊乱,甚至出现囊泡变。众所周知,线粒体是“细胞的动力工厂”,除了为细胞供能外,还参与细胞分化、细胞信息

传递和细胞凋亡等过程,并拥有调控细胞生长和细胞周期的能力,是对各种损伤最为敏感的细胞器,线粒体的上述变化可见于多种损伤因子引起的病理过程,为细胞损害的最敏感指征^[9]。此外,病变晚期时穿越类高内皮微静脉的淋巴细胞很少见到,而且肿瘤组织内以及癌周区的浸润淋巴细胞也明显减少。我们认为可能是随着肿瘤进程的演进,肿瘤细胞产生的细胞因子对 endothelial 细胞的损伤作用增强,致使其淋巴细胞穿越功能下降^[10]。

由此可见,肿瘤晚期类高内皮微静脉内皮细胞的基因转录、物质合成和代谢能力与肿瘤早期相比有很大程度的下降,导致淋巴细胞归巢能力低下。目前的研究认为肿瘤浸润淋巴细胞是肿瘤患者生存率和局部扩散的一个非常重要的预后因素^[11]。有研究报道肿瘤细胞可产生一种肿瘤纤溶酶,可以使基膜和细胞外基质中的纤维蛋白溶解,从而有利于肿瘤细胞侵犯邻近的正常组织^[12]。喉癌晚期病变组织内肿瘤浸润淋巴细胞明显减少,类高内皮静脉的基膜不完整,因此晚期肿瘤细胞容易转移和扩散。

3.2 蛋白多糖

蛋白多糖(PG)是一类非常复杂的大分子蛋白多糖复合物,在免疫细胞归巢、组织炎症、肿瘤的发生和发展等方面起重要作用^[13,14]。有研究表明衬于血管壁内皮细胞表面的多糖-蛋白质复合物调节血管屏障功能和细胞粘附。表面的多糖-蛋白质复合物层是由蛋白聚糖和粘多糖构成,多糖-蛋白质复合物层的减少已被发现存在许多疾病,包括动脉粥样硬化、炎症、心肌水肿和糖尿病^[15]。本实验中,我们发现在喉癌早期病变组织内的类高内皮静脉壁,特别是邻近管腔侧呈强阳性普鲁士兰着色,这说明此期类高内皮静脉管腔侧分布有大量蛋白多糖。

现在的研究认为淋巴细胞穿越高内皮微静脉归巢至淋巴组织是在多种粘附分子和趋化因子等的参与下与高内皮微静脉内皮细胞之间发生的多步骤(接触粘附-滚动-牢固粘附-穿越内皮和基膜)的、复杂的迁移过程^[16-18]。Kathirvel 等研究报道向大鼠肺灌注脂多糖 90 分钟后图像分析发现与未灌注处的血管相比,在脂多糖灌注处理的静脉和毛细血管内的白细胞滞留增加,原位免疫荧光实验发现白细胞滞留增加的机制是由于脂多糖显著增加微血管内皮细胞的 ICAM-1 的表达^[19],从而增加白细胞与内皮之间的粘附机会。此外,有研究证明次级淋巴组织趋化因子对淋巴细胞有很强的趋化作用,尤其对归巢到周围淋巴器官的初始 T 细胞有更大的趋化活性^[20]。次级淋巴组织趋化因子高表达于 HEVS, Gunn 等通过活体显微镜观察发现次级淋巴组织趋化因子定位于 HEV 的内皮表面,可快速激发整合素与血管壁上的配体结合。趋化因子的分子量小,多为 8-14 kD 的可溶性碱性分泌蛋白质,容易扩散。研究认为具有强阴性电荷的 PG 与带有阳性电荷碱基的次级淋巴组织趋化因子结合后可以防止次级淋巴组织趋化因子的扩散,维持其局部相对的高浓度。因此,PG 可协同次级淋巴组织趋化因子发挥趋化作用^[21,22]。

本研究结果显示,在喉癌早期病变组织内的类高内皮静脉壁特别是邻近管腔侧在淋巴细胞穿越的部位着色更强,而腔内和穿越内皮细胞的淋巴细胞几乎不着色,推测这些蛋白多糖可能通过协同增强次级淋巴组织趋化因子的作用来调节淋巴细胞穿越类高内皮微静脉向淋巴组织浸润的归巢运动。这也从侧

面说明了淋巴细胞归巢路径中蛋白多糖扮演着重要的角色。在喉癌早期病变组织内,类高内皮静脉蛋白多糖含量丰富,调节淋巴细胞归巢的能力较强,机体对抗肿瘤的免疫能力相对较强,瘤细胞不容易扩散。

此外,我们发现在喉癌晚期病变组织内类高内皮微静脉不仅少见,而且普鲁士兰着色较弱,说明与早期病变相比较,晚期病变组织内的类高内皮微静脉蛋白多糖分布也减少,这势必影响淋巴细胞的归巢,即影响初始 T 淋巴细胞和细胞毒性 T 细胞穿越类高内皮微静脉向肿瘤组织内的浸润。本实验中,我们确实也发现晚期病变组织内浸润淋巴细胞明显减少,进一步验证了类高内皮微静脉和其表面表达的蛋白多糖在淋巴细胞归巢中起着重要的作用。在晚期喉癌组织内类高内皮静脉蛋白多糖表达较少,调节淋巴细胞归巢的能力较弱,机体对抗肿瘤的免疫能力下降,瘤细胞容易扩散。有研究表明肝素酶随着肿瘤的进展而增加。Miyamoto 等^[23]发现在结肠癌组织中,细胞从严重的不典型增生经高分化到低分化结肠癌的进展过程中肝素酶水平在逐渐增加。可见,蛋白多糖的减少主要是由于在肿瘤晚期,相关的特异性降解酶增多,导致蛋白多糖被大量降解。

总之,通过研究我们发现人喉癌组织中部分毛细血管后微静脉可演变为类高内皮微静脉,是淋巴细胞向癌组织中浸润的重要场所;肿瘤组织中的淋巴细胞归巢与抗肿瘤密切相关。蛋白多糖于淋巴细胞归巢旺盛的类高内皮微静脉呈强表达,可能对归巢淋巴细胞穿越类高内皮微静脉有调节作用。虽然通过本研究我们揭示了 PG 在类高内皮微静脉上的表达、分布以及在淋巴细胞归巢中可能发挥的调节作用,但若想系统、深入且彻底的认识 PG 在淋巴细胞归巢中发挥何种作用以及如何发挥作用还需要进一步深入的研究。

参考文献(References)

- [1] Butcher EC and Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis[J]. Science, 1996, 272(5258): 60-66
- [2] Binns RM Licence ST, and Wooding FB. Phytohemagglutinin induces major short-term protease-sensitive lymphocyte traffic involving high endothelium venule-like blood vessels in acute delayed-type hypersensitivity-like reactions in skin and other tissues [J]. Eur J Immunol, 1990, 20(5): 1067-1071
- [3] Stearns GS, Keithley EM, and Harris JP. Development of high endothelial venule-like characteristics in the spiral modiolar vein induced by viral labyrinthitis[J]. Laryngoscope, 1993, 103(8): 890-898
- [4] Ruoslahti E. Proteoglycans in cell regulation [J]. J Biol Chem, 1989, 264(23): 13369-13372
- [5] Johnston B, Kim CH, Soler D, et al. Differential chemokine responses and homing patterns of murine TCR α beta NKT cell subsets[J]. Cell Immunol, 2003, 171(6): 2960-2969
- [6] 张灿. 趋化性细胞因子及其受体和淋巴细胞的迁移[J]. 国外医学免疫学分册, 2002, 25(5): 228-234
- [7] Zhang Can. Chemoattractant cytokines and their receptors and migration of the lymphocyte [J]. Archives of foreign medical immunology, 2002, 25(5): 228-234
- [8] Kim CH, Pelus LM, Appelbaum E, et al. CCR7 ligands SLC6CKine/Exodus2/TCA4 and CKb-11/MIP-3b/ELC, are chemoattractants for CD56 (+) CD16 (-) NK cells and late stage lymphoid progenitors[J]. Cell Immunol, 1999, 193(1): 226-231

- [16] Aoyagi K, Kouhiji K, Miyagi M, et al. Expression of p27Kip1 protein in gastric carcinoma [J]. *Hepatogastroenterology*, 2013, 60(122): 390-394
- [17] 张雅军, 霍建民. S 期激酶相关蛋白 2 在非小细胞肺癌中的表达意义及其与 PTEN 和 p27 表达的关系 [J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21(22): 2729-2734
- Zhang Ya-jun, Huo Jian-min. Skp2 expression in NSCLC and its relationship with PTEN and p27 [J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2011, 21(22): 2729-2734
- [18] 刘东, 肖培, 王明耀, 等. Skp2 和 P27 在非小细胞肺癌组织中的表达及其临床意义[J]. *中国现代医生*, 2010, 48(13): 8-9, 14, 封 3
- Liu Dong, Xiao Pei, Wang Ming-yao, et al. Expression and Clinical Significance of Skp2 and P27 in Non-small Cell Lung Cancer [J]. *China Modern Doctor*, 2010, 48(13): 8-9, 14, 封 3
- [19] 李长栓, 王红岩, 田建军, 等. Skp2 与 p27 蛋白的表达与肺癌的关系[J]. *国际呼吸杂志*, 2009, 29(2): 65-67
- Li Chang-shuan, Wang Hong-yan, Tian Jian-jun, et al. Expression of Skp2 and p27 protein and their clinical significance in lung cancer[J]. *International Journal of Respiration*, 2009, 29(2): 65-67
- [20] 胡晓华, 刘峰, 姜斌, 等. 非小细胞肺癌中 Skp2 的表达及其与 p27 蛋白表达的关系[J]. *中国肺癌杂志*, 2008, 11(4): 547-550
- Hu Xiao-hua, Liu Feng, Jiang Bin, et al. The expression of Skp2 in human non-small cell lung cancer and its correlation with expression of p27 protein [J]. *Chinese Journal of LungCancer*, 2008, 11 (4): 547-550

(上接第 2262 页)

- [8] Pfau S, leitenberg D, rinder H, et al. Lymphocyte adhesion-dependent calcium signal in human endothelial cells[J]. *J cell Biol*, 1995, 128 (4): 969-973
- [9] Figge MT, Osiewicz HD, Reichert AS. Quality control of mitochondria during aging: Is there a good and a bad side of mitochondrial dynamics[J]. *Bioessays*, 2013, 35(4): 314-322
- [10] Severi T, Van Malenstein H, Verslype C, et al. Tumor initiation and progression in hepatocellular carcinoma: risk factors, classification, and therapeutic targets [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31 (11): 1409-1420
- [11] Martinet L, Guellec LS, Filleron T, et al. High endothelial venules (HEVs) in human melanoma lesions: Major gateways for tumor-infiltrating lymphocytes [J]. *Oncoimmunology*, 2012, 1 (6): 829-839
- [12] Chen H, Takahashi S, Imamura M, et al. Earthworm fibrinolytic enzyme: anti-tumor activity on human hepatoma cells in vitro and in vivo[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2007, 120(10): 898-904
- [13] Kim SH, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor[J]. *J. Endocrinol*, 2011, 209(2): 139-151
- [14] Yurchenco PD and Patton BL. Developmental and Pathogenic Mechanisms of Basement Membrane Assembly [J]. *Curr Pharm Des*, 2009, 15(12): 1277-1294
- [15] Yen WY, Cai B, Zeng M, et al. Quantification of the endothelial surface glycocalyx on rat and mouse blood vessels[J]. *Microvasc Res*, 2012, 83(3): 337-346
- [16] Umemoto E, Hayasaka H, Bai Z, et al. Novel Regulators of Lymphocyte Trafficking across High Endothelial Venules[J]. *Crit Rev Immunol*, 2011, 31(2): 147-169
- [17] Tohya K, Umemoto E, Miyasaka M, et al. Microanatomy of lymphocyte-endothelial interactions at the high endothelial venules of lymph nodes[J]. *Histol and histopathol*, 2010, 25(6): 781-794
- [18] Franciszkievicz K, Boissonnas A, Boutet M, et al. Role of Chemokines and Chemokine Receptors in Shaping the Effector Phase of the Antitumor Immune Response [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(24): 6325-6332
- [19] Kandasamy K, Sahu G and Parthasarathi K. Real-time imaging reveals endothelium-mediated leukocyte retention in LPS-treated lung microvessels[J]. *Microvasc Res*, 2012, 83(3): 323-331
- [20] Subramanian H, Grailer JJ, Ohlrich KC, et al. Signaling through L-Selectin Mediates Enhanced Chemotaxis of Lymphocyte Subsets to Secondary Lymphoid Tissue Chemokine [J]. *J Immunol*, 2012, 188: 3223-3236
- [21] Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, et al. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization [J]. *J exp Med*, 1999, 189(3): 451-460
- [22] K Tsuboi, J Hirakawa, E Seki, et al. Role of High Endothelial Venule-Expressed Heparan Sulfate in Chemokine Presentation and Lymphocyte Homing[J]. *J Immunol*, 2013, 191: 448-455
- [23] Miyamoto S, Nakamura M, Yano K, et al. Matrix metalloproteinase-7 triggers the matricrine action of insulin-like growth factor-II via proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein 2 in the extracellular matrix[J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(5): 685-691