

骨巨细胞瘤细胞成分和细胞因子在溶骨中的作用^①

谢丹 文剑明 林汉良 张萌 孙来保 姚俊霞

(中山医科大学病理教研室; 广州, 510089)

摘要 目的: 探讨骨巨细胞瘤(GCT)各细胞成分及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1(IL-1)细胞因子在骨吸收中的作用。方法: 采用细胞分离技术和体外细胞溶骨模型, 检测 GCT 各细胞成分的骨吸收活性及 TNF- α 和 IL-1 对这种活性的影响。结果: 在溶骨模型中, 多核巨细胞(MGC)的数目越多, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 的释放也越多; 纤维母细胞样基质细胞(FC)组的 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 值明显高于无细胞对照组 ($P < 0.01$), 而与骨肉瘤细胞组比较, 无显著差异; 此外, FC 的条件培养液能大大增强 MGC 溶骨模型中 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 的释放 ($P < 0.01$); 原代单核基质细胞(SC)经 TNF- α 处理后, 其模型中 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 释放明显增高 ($P < 0.01$), 而 IL-1 未见类似作用。结论: 在 GCT 中, 多核巨细胞具有直接溶骨的作用; 纤维母细胞样基质细胞, 除直接溶骨外, 还可以分泌某种物质促进多核巨细胞的溶骨效应; TNF- α 能增强原代单核基质细胞的溶骨能力。

关键词 骨巨细胞瘤/病理学; 骨质吸收/病理学; 肿瘤坏死因子; 白细胞介素-1

中图分类号 R 738.1; R 361.3

THE BONE RESORPTION ACTIVITY OF DIFFERENT CELL COMPONENTS IN GIANT CELL TUMOR OF BONE WITH REFERENCE TO THE EFFECT OF CYTOKINES

Xie Dan Wen Jianming Lin Hanliang Zhang Meng Sun Laibao Yao Junxia

(Department of Pathology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

Abstract Objective: To explore the bone resorption activity of different cell components in Giant cell tumor of bone (GCT) with reference to the effect of Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and Interleukin-1(IL-1). **Methods:** Cell separation technics and in vitro model of bone resorption by cells were used to detect the osteolytic capability of different cell components in GCT. The function of TNF- α and IL-1 in GCT's bone resorption were also detected. **Results:** In bone resorption model, the more multinucleated giant cells (MGC) present, the higher will be the level of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ released. The $^{45}\text{Ca}^{2+}$ levels of fibroblast-like stroma cell (FC) group were significantly higher than that of no cell's group ($P < 0.01$), while there was no significant difference between FC group and osteosarcoma cell group. In addition, the conditioned medium of FC could enormously increase the levels of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ released from MGC's model ($P < 0.01$). After treatment by TNF- α , the stroma cells could increase the levels of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ released from it's bone resorption model ($P < 0.01$), but IL-1 did not have similar effect. **Conclusions:** In GCT, the multinucleated giant cells has the ability to resorb bone matrix directly. The fibroblast-like stroma cells could not only resorb bone matrix directly, but also secret unknow material to promote bone resorption of multinucleated giant cells. TNF- α has the ability to promote bone resorption of GCT's stroma cells.

Subject headings giant cell tumor of bone/pathology; bone resorption/pathology; tumor necrosis factor; interleukin-1

骨巨细胞瘤(giant cell tumor of bone, GCT)是一种常见的骨关节肿瘤,局部主要表现为溶骨性病变。由于破骨细胞样多核巨细胞是GCT的重要组成部分,因而很多学者认为,多核巨细胞是GCT骨吸收的原因^[1,2]。然而,在病理分级中,I级GCT组织中的多核巨细胞数量多于III级,但III级的局部溶骨性改变却比I级严重得多,提示GCT的溶骨行为并非单一多核巨细胞作用所致,很可能是多种细胞成分参与的结果。TNF- α 和IL-1已被证实为破骨细胞活化因子^[1,3],而且在GCT中有相当的表达^[4]。但这些因子在GCT溶骨过程中的作用,至今未见文献报道。我们通过分离GCT中的单核基质细胞和多核巨细胞,并加入外源性的TNF- α 和IL-1,分别作用于体外溶骨模型,探讨GCT中各细胞成分及上述细胞因子在骨质吸收中的作用。

1 材料与方 法

1.1 标本来源

11例GCT和6例骨肉瘤(osteosarcoma OSC)手术标本取自中山医科大学附属第一医院骨科,GCT分级I~II级,另5例骨肉瘤培养细胞由本细胞室提供。

1.2 细胞成分的分离与处理

将新鲜肿瘤标本剪碎,用0.1%的胶原酶(Sigma)消化30min,制得瘤细胞悬液,通过50 μ m孔径的不锈钢网过滤。将隔在网上的细胞洗脱下来,获得多核巨细胞(multinucleated giant cell MGC);收集滤过的细胞,即为GCT的原代单核基质细胞(stroma cell SC),其中包括纤维母细胞样和巨噬细胞样基质细胞;分别将含 5×10^{-9} mol/L的TNF- α 和 0.2×10^{-9} mol/L的IL-1新鲜培养液加入 5×10^6 个SC中,处理72h,制得处理后的SC;另外,将SC常规培养,传代20次以上,得到一致的长梭型单核细胞即为纤维母细胞样基质细胞(FBC),将 10^6 个FBC接种在培养瓶,加新鲜培养液10mL,培养48h离心,取上清液作为条件培养液(conditioned medium)。

1.3 灭活的⁴⁵CaCl₂标记骨的制备^[5]

选取同胎生,大小重量相当的3d龄NHI小鼠,腹腔内注射 10μ Ci ⁴⁵CaCl₂溶液,3d后处死,取左右对称的蝶型颅顶骨,置微波炉中煮沸3min后随机分为实验组和对照组。

1.4 体外溶骨实验

将实验组和对照组颅盖骨片分别置于96孔培

养板的孔内,凹面朝上。每孔加入400 μ L的培养液,按下列配伍进行实验,各组均重复3次:①分别将 10^3 、 5×10^3 、 10^4 个MGC和加入100 μ L的纤维母细胞样基质细胞条件培养液的 10^4 个MGC,随机加入实验组的颅骨片上,对照组不加细胞。②将 10^5 个FBC加入实验组的颅骨片上,对照组为无细胞组和 10^5 个骨肉瘤细胞组。③分别将 10^5 个SC、用IL-1或TNF- α 处理的 10^5 个SC随机加入实验组的颅骨片上,对照组不加细胞。将上述各组置孵箱中培养24h或更换培养液继续培养48h。

1.5 液闪测定

从孔中取出100 μ L上清液作液体闪烁计数(Backman 380型),每个样本检测1min,记录放射性核素⁴⁵Ca²⁺的计数值。

1.6 统计学处理

计量资料⁴⁵Ca²⁺min⁻¹值以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异用方差分析、*q*检验,以 $P < 0.05$ 为显著性差异界限。

2 结 果

2.1 GCT多核巨细胞的体外溶骨

从表1可见,将不同数目的多核巨细胞加入标记颅骨片中培养24h,各实验组⁴⁵Ca²⁺的释放与对照组比较有明显差异($P < 0.05$)。随着细胞数目增加,⁴⁵Ca²⁺的释放也随之增多。加条件培养液组的⁴⁵Ca²⁺值大大增加($P < 0.01$)。

表1 GCT多核巨细胞的溶骨中⁴⁵Ca²⁺检测结果

Tabl 1 The results of ⁴⁵Ca²⁺ levels in bone resorption by MGCs of GCT ($\bar{x} \pm s$)

Cell number	Case (n)	min ⁻¹	<i>P</i> ¹⁾
0 MGC ²⁾	11	912 \pm 135	
1 \times 10 ³ MGC	11	1224 \pm 71	< 0.01
5 \times 10 ³ MGC	11	1348 \pm 288	< 0.05
1 \times 10 ⁴ MGC	11	1387 \pm 176	> 0.05
10 ⁴ MGC+CM	11	2002 \pm 303	< 0.01

1) The *P* values in the table were compared with former group; 2) MGC; multinucleated giant cell; 3) CM; conditioned medium

2.2 GCT纤维母细胞样基质细胞的体外溶骨

从表2可见,纤维母细胞样细胞组与对照的无细胞组比较,其⁴⁵Ca²⁺值有显著性差异($P < 0.01$);与骨肉瘤细胞组比较则无差异。

表2 GCT 纤维母细胞样细胞和骨肉瘤细胞溶骨中 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 检测结果Table 2 The results of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ levels in bone resorption by FCs of GCT and OSCs ($\bar{x} \pm s$)

Cell number	Case(n)	24 h		48 h	
		min^{-1}	$P^{1)}$	min^{-1}	$P^{1)}$
0 FBC	11	939 \pm 173		728 \pm 132	
1 \times 10 ⁵ FBC ²⁾	11	1 089 \pm 298	< 0.01	916 \pm 184	< 0.01
1 \times 10 ⁵ OSC ³⁾	11	1 093 \pm 275	> 0.05	931 \pm 176	> 0.05

1)The P values in the table were compared with former group; 2)FBC; fibroblast-like cell; 3)OSC; osteosarcoma cell

2.3 GCT 原代单核基质细胞体外溶骨

从表3可见, GCT 原代单核基质细胞有溶骨能力, 与对照组比较, 其 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 值有显著差异。而

TNF- α 处理的 SC 组 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 的释放比未处理的 SC 组明显增加($P < 0.01$), IL-1 却未见类似作用($P > 0.05$)。

表3 GCT 原代单核基质细胞溶骨中 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 检测结果Table 3 The results of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ levels in bone resorption by SCs of GCT ($\bar{x} \pm s$)

Cell number	Case(n)	24 h		48 h	
		min^{-1}	$P^{1)}$	min^{-1}	$P^{1)}$
0 SC	11	951 \pm 125		716 \pm 123	
1 \times 10 ⁵ SC ³⁾	11	1 633 \pm 254	< 0.01	1 201 \pm 197	< 0.01
10 ⁵ SC+ TNF- α	11	1 754 \pm 305	< 0.01	1 396 \pm 226	< 0.01
10 ⁵ SC+ IL-1	11	1 568 \pm 275	> 0.05 ²⁾	1 246 \pm 186	> 0.05 ²⁾

1)The P values in the table were compared with former group; 2)The P values in the table were compared with 1 \times 10⁵ SC group; 3)SC; stroma cell

3 讨论

GCT 具有很强的局部溶骨能力。由于破骨细胞样多核巨细胞是该肿瘤的主要成分, 以往的研究多集中在多核巨细胞的溶骨作用上。Chambers 等人^[1]从 GCT 中分离出多核巨细胞, 体外作用于骨片后, 用光镜、电镜观察到多核巨细胞对骨片的吸收, 并证实前列腺素 E1、降钙素等钙调节激素能影响多核巨细胞的骨吸收能力。Kaneshisa 等人^[2]发现 GCT 中的多核巨细胞具有破骨细胞的功能结构: 皱褶缘和清晰带, 它与骨表面接触后, 便能象正常破骨细胞一样吸收骨质。本实验用分离的多核巨细胞与同位素标记的鼠颅骨共同培养, 也证实了多核巨细胞的骨质吸收能力。而且多核巨细胞的数量越多, 溶骨效应越明显。

然而, 病理形态学显示, GCT 破坏骨质的程度, 并不完全取决于肿瘤中所含的多核巨细胞的多少。是否其它细胞成分也参与了骨质吸收过程, 至今还未有实验直接证明。纤维母细胞样基质细胞

已被认为是 GCT 中的肿瘤性细胞, 又是唯一能在体外培养中长期递增增殖的细胞^[6]。我们用培养 20 代以上的纤维母细胞样细胞单独加入体外溶骨模型中, 直接证实了该细胞具有很强的骨质吸收能力, 其单独溶骨效应与骨肉瘤细胞相当。但其直接溶骨的确切机制, 目前仍不清楚。近来有资料显示, GCT 中的纤维母细胞样基质细胞可通过分泌尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA), 在 GCT 的侵袭生长过程中参与细胞外基质的溶解^[7]。事实上, uPA 是胶原酶原等金属蛋白酶原的激活物^{8,9}。我们推测, 纤维母细胞样基质细胞的直接溶骨作用, 可能与激活胶原酶溶解骨胶原有关。此外, 我们还发现, 将纤维母细胞样基质细胞的条件培养液加入多核巨细胞的溶骨模型中, 能大大地增强后者的溶骨效应。以上结果提示: 纤维母细胞样基质细胞除直接参与溶骨外, 还可分泌某种物质促进多核巨细胞的溶骨能力。究竟这种物质是什么? 有待进一步阐明。我们实验中还显示(比较表 2 和表 3), 巨噬细胞样和纤维母细胞样细胞组成的原代基质细胞比单一的纤维母细胞样细胞有更强的骨质

吸收作用。可能这两种细胞在溶骨中有协同作用。

TNF- α 和 IL-1 已被证实能增强破骨细胞对骨质的吸收^[3], Yasuyuki 亦发现 GCT 组织能分泌 TNF- α 和 IL-1^[4]。然而, 我们的实验结果显示: 在没有多核破骨细胞参与的情况下, TNF- α 也能促进 GCT 中两种单核基质细胞溶骨作用。我们分析: TNF- α 对 GCT 溶骨的促进作用不只局限于破骨细胞; 而 IL-1 未能有上述效应, 可能它在溶骨中的促进作用, 仅仅是最终激活了破骨细胞。

我们认为: GCT 特征性溶骨的生物学行为, 决非多核巨细胞单独作用所致, 而是多种细胞成分及其所分泌的 TNF- α 等细胞因子相互影响, 共同作用于局部骨质的结果。其中纤维母细胞样基质细胞是 GCT 的主体细胞, 又是唯一的肿瘤性细胞, 在 GCT 的溶骨中可能起主导地位。

参 考 文 献

- 1 Chambers T J, Fuller K, Mcsheely P M J. The effect of calcium regulating hormones on bone resorption by isolated human osteoclastoma cells. *J Pathol*, 1985, 145: 297
- 2 Kaneshisa J Y, Izumo T Y K, Takeuchi M K, *et al*. In vitro bone resorption by isolated multinucleated giant cells from giant cell tumor of bone: light and electron microscopic study. *Virch Arch A (Pathol Anat)*, 1991, 419 (2): 327

- 3 Kmagta K, Miyasaka N, Inoue H, *et al*. Study of cytokine production in inflamed human gingival tissue in periodontitis. Interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Nippon Shishubyo Gakkai Kaishi*, 1989, 319(3): 843
- 4 Yasuyuki S, Setsuro K, Kazushige S, *et al*. Production of matrix metalloproteinases 2 and 3 (stromelysin) by stromal cell of giant cell tumor of bone. *Am J Pathol*, 1992, 141 (3): 611
- 5 Richard O C, Marshall Mary K, *et al*. Characterization of a cell line derived from a human giant cell tumor of bone that stimulates osteoclastic bone resorption. *Clin Orthop*, 1993, 296: 229
- 6 Burmester G R, Winchest R J, Dimitriu B A, *et al*. Delineation of four cell types comprising the giant cell tumor of bone. *J Clin Invest*, 1983, 71(6): 1033
- 7 Zheng M H, Fan Y, Panicker A, *et al*. Detection of mRNA for urokinase-type plasminogen activator, its receptor, and type I inhibitor in giant cell tumor of bone with in situ hybridization. *Am J Pathol*, 1995, 147(6): 1559
- 8 Polana J, Saksela O, Salonen E M, *et al*. Distinct localization of urokinase-type plasminogen activator and its type I inhibitor under cultured human fibroblasts and sarcoma cells. *J Cell Biol*, 1987, 104: 1085
- 9 Kwaan H C. The Plasminogen-plasmin system in malignancy. *Cancer Metast Rev*, 1992, 11: 191

(1997-06-27 收稿 1997-11-28 修回)

· 简 讯 ·

本刊目录和稿约业已连通 INTERNET

《中山医科大学学报》现已以光纤直接接通 Internet 网。本刊的 1997 年第 1、2、3、4 期和增刊以及 1998 年第 1、2、3 期及增刊的所有中英文目录都可以在网上浏览而得到, 上网途径是连入广州中山医科大学的主页后, 选择“出版物”再选择“学术刊物(期刊中心出版的)”, 或者选择“院系设置”后再选择“中心”, 可见到“期刊中心”, 亦可在“电子图书馆”里选择“校内期刊”, 选中后可以看到中山医科学术期刊中心出版的所有学术刊物, 包括本刊, 选中本刊后则可以任意浏览本刊自 1997 年以来的各期目录。以后本刊的各期目录都将及时地加载入网上, 请读者及时留意观看。

《中山医科大学学报》稿约亦已上网, 作者投稿时可随时随地参看本部稿约。上网途径同上。

读者或作者上网后, 可以依据网上提供的电子邮件地址(xuebao@gzsums.edu.cn)直接给本部发电子邮件。

注意, 若中文字显示比较乱, 则注意选择文件解码(Document Encoding)为简体中文(Simplified Chinese); 若选择“院系设置”后的“中心”后只见表格不见文字则有可能是显示器的颜色设置太少, 可以设为 256 色, 再进入则可。

(本刊编辑部)