

# 骨巨细胞瘤体外培养及其生物学特性的观察<sup>①</sup>

刘子君<sup>②</sup> 丘钜世 王连唐 文剑明 张 萌 朱全胜 梁凤英 黄春浓

(中山医科大学病理学教研室, 广州, 510089)

**提 要** 1983~1992年作者通过组织培养, 组化及免疫组化、电镜、细胞遗传学, 动物接种等方法, 对骨巨细胞瘤(GCT)的生物学特性进行研究, 认为GCT的基质细胞有两种, 即间叶性基质细胞及巨噬细胞性基质细胞, 巨噬细胞性基质细胞可能为许多种不同的巨噬细胞混合体, 这两种类型细胞在瘤组织内互相依赖存活。在体外培养见巨噬细胞性基质细胞逐渐减少而消亡, 间叶性基质细胞则在没有巨噬细胞性基质细胞的情况下也容易老化及消亡, 故目前尚未有本瘤的细胞株建立。多核巨细胞是一反应性及终末性细胞, 可能由于基质细胞分泌目前尚未清楚的细胞因子, 吸引血中破骨细胞前身的单核巨噬细胞到瘤组织内, 并促进其分化成破骨细胞样多核巨细胞。

**关键词** 骨巨细胞瘤; 组织培养; 免疫组化; 细胞遗传学

**中图分类号** R738.1; Q28

骨巨细胞瘤(GCT)在我国远较欧美多见, 其原因未明<sup>[1]</sup>, 故在我国GCT的组织发生学, 细胞生物学等研究, 有实际意义。我们自1983~1992年共进行细胞培养28例次, 对瘤细胞生长特性, 组化及免疫组化, 电镜观察, 动物接种, 以及瘤细胞遗传学特性进行研究, 小结如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 HE染色

骨巨细胞瘤组织学分级: I级, 单核的基质细胞分化较好, 即未见明显异型性, 多核巨细胞(MGC)数量多, 细胞核数也多; II级, 单核基质细胞明显异型性, 可出现核分裂, MGC少, 细胞核数也少; 介于I级和II级之间为I级。

### 1.2 组织培养

28例GCT, 其中I~II级26例, III级2例。用MEM, Eagle培养液及RPMI 1640培

养液各半配制后, 加入灭活小牛血清20%成培养液。每毫升培养液含200U双抗, 每次传代用0.25%胰酶及0.5%EDTA消化, 在含5%CO<sub>2</sub>的37℃恒温箱内静置培养, 待细胞长满小方瓶后再传代。

### 1.3 组化及免疫组化

用盖玻片放置在小方瓶内, 让瘤细胞在盖玻片生长至旺盛期, 然后取出用PBS液冲洗, 放于冷丙酮液内固定10min, 取出凉干后放入-20℃冰箱内保存。组化染色包括酸性磷酸酶(ACP), 碱性磷酸酶(AKP), 非特异性酯酶(ANAE)。免疫组化包括波形蛋白(Vm), M718, HLA-DR, S-100蛋白(S-100), 第VIII因子, 溶菌酶(Lys), 抗胰糜蛋白酶(AACT)。用ABC法, DAB显色, 苏木素染色对比。

### 1.4 电镜观察

将瘤细胞在培养瓶消化后, 离心, 弃上清后将瘤细胞在滤纸上包封, 置于0.25%冷戊

① 国家教委博士点基金资助课题;

② 第一作者, 64岁, 男, 教授

二醛液固定 24h,用钨酸后固定,水洗及逐级酒精脱水,812 包埋,超薄切片及染色,在 H-100 型透射电镜下观察。

### 1.5 细胞遗传学

用生长旺盛期瘤细胞在收获前加入秋水仙素,经低渗,固定,烤干制片,Giemsa 染色及 G 显带染色,油镜下观察。

### 1.6 动物接种

用生长旺盛期瘤细胞制成  $5 \times 10^6$  细胞浓度取 0.5ml,注射入裸鼠皮下,观察瘤结的出现及生长情况。

## 2 结果

### 2.1 培养过程

静置培养后 24h 见游走性白细胞,巨噬细胞等开始从植块移出,其后见梭形的基质细胞及多核巨细胞出现,形成生长晕(图 1)。

1 周后炎症细胞及多核巨细胞大部坏死,而基质细胞继续增生,并见相互连接成网状,一些细胞肥大呈上皮形,梭形或多角形(图 2)。初代培养至 20~25d 长满及传代。一般在 10 代以前生长较快,约 5~9d 可传代 1 次。多核巨细胞一般在传代后消失,最长者偶见传代 4 次还可见到,均为 GCT I~II 级病例。在 28 例中 5 例培养不成功,13 例培养到 10 代即终止,放入液氮内保存,其中 8 例培养到 20 代,另 2 例作了较长期的培养,其中 GT<sub>12</sub> 传代 49 代,为期 280d,GT<sub>25</sub> 传代 59 代,为期 520d。

### 2.2 生长情况

3 例作生长情况观察,即 GT<sub>21</sub> 第 10 代,GT<sub>20</sub> 第 5 代,及 GT<sub>15</sub> 第 54 代各 2 瓶,传代细胞密度为  $0.4 \times 10^6$  个/瓶,每隔 24h 计数,细胞的生长情况见表 1。

表 1 体外骨巨细胞瘤培养细胞生长情况

细胞类别(代)	生长天数										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GT <sub>21</sub> (P <sub>10</sub> )	0.8	1.2	1.2	2.6	5.3	7.3	10.2	16.4	30.5	25.4	25.4
GT <sub>20</sub> (P <sub>5</sub> )	0.8	0.5	0.8	1.5	2.3	2.9	4.1	9.0	6.1	6.0	5.8
GT <sub>15</sub> (P <sub>54</sub> )	0.8	1.6	2.3	3.3	4.0	4.1	4.5	5.0	4.8	4.0	3.0

注:细胞生长数量单位为  $\times 10^6$  个/瓶

从表 1 见瘤细胞在 5 代前生长慢,以后则生长较快,至 50 代以后逐渐变慢,故生长较快者 3~5d 可传代,较慢者 7~12d 可传代,衰老期者要 14d 以上才长满传代。

### 2.3 瘤细胞形态特点

将 6 例培养于盖玻片上的瘤细胞经 HE 染色,光镜下按形态特征计数 500 个瘤细胞以算出其平均值百分比。结果为梭形细胞占 50%~60%,多角形细胞 25%~35%,类圆形细胞 1%~3%,多核或单核瘤巨细胞 8%~15%。多核瘤巨细胞核数为 2~4 个,互相重叠或如镜影样,巨核者其核比其它瘤细胞核大 1/2 以上。

### 2.4 透射电镜观察<sup>[2]</sup>

瘤细胞为类圆形,胞质丰富及表面有较多微绒毛突起。核型不规则,异型性明显,呈分叶状或环形核。核仁较大的胞质内有较多的粗面内质网,似间叶细胞样,另一些则具较多溶酶体似巨噬细胞样。

### 2.5 组化及免疫组化反应

组化 ACP 及 ANAE 在多核巨细胞呈阳性反应,仅部分基质细胞呈阳性反应。免疫组化反应见大部分基质细胞对 Vm 阳性,多核巨细胞阴性反应。基质细胞可对一种或多种有关巨噬细胞抗体呈阳性反应,但 2 例 III 级 GCT 对溶菌酶为阴性反应,所有瘤细胞对 EMA 及第 VIII 因子阴性反应,部分基质细胞

对 S-100 呈阳性反应(图 3)。GCT 免疫组化 反应见表 2<sup>[7]</sup>。

表 2 骨巨细胞瘤免疫组化反应

类 型	Vm	EMA	AACT	S-100	Lys	HLA-DR	M718	KB90	LCA
基质细胞 G I ~ I	+++ <sup>1)</sup>	-	++ <sup>2)</sup>	+	+	(+) <sup>3)</sup>	(+)	(-)	(+)
基质细胞 G II	+++	-	+	+	-	未做	-	未做	-
多核巨细胞	-	-	+	-	-	(-)	+++	(-)	-
GT <sub>15</sub> 培养基质细胞	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
内皮细胞	-	-	-	-	-	(-)	(-)	(-)	(-)

1)+++ >50%, 2)++ 20%~50%, 3)括号代表冰冻切片结果

## 2.6 细胞遗传学

培养细胞系中 GT<sub>12</sub>的第 27 代,GT<sub>15</sub>的原代及第 19 代,和 GT<sub>20</sub>的第 24 代,做了染色体常规分析。

2.6.1 染色体数目畸变 4 例次中的 134 个分析细胞中,122 个出现数目异常,畸变率达 91%,其变动范围主要集中在亚二倍体与超二倍体之间,以亚二倍体最多见(88/122, 约占 72.1%)。多于三倍体者少见(14/122, 约 11%)。

2.6.2 染色体结构畸变 对 4 例次 16 个核型分析表明,染色体末端融合是最常见的细胞遗传学改变,累及 5pter, 11pter, 16pter, 19qter, 20qter(图 4)。染色体末端缺失也较常见,累及 4 号,5 号,7 号,12 号,13 号,22 号。此外还发现异位,等臂染色体,双微体。

## 2.7 动物接种

用瘤细胞分 3 次接种 6 只裸鼠,其中一只(GT<sub>15</sub>)经 1 周后有瘤结出现,但长势慢,1 月后瘤结直径达 0.8cm。切出常规病理切片观察,见瘤细胞与机化肉芽组织相混,说明瘤细胞能逐渐机化而消失,这可解释其余各裸鼠不成瘤原因之一。

## 3 讨 论

GCT 的组织发生学仍未清楚,目前较多资料证明,瘤组织内的多核巨细胞与破骨细胞相似,因而命名为骨巨细胞瘤或破骨细胞

瘤。从我们多方面资料进一步证实这些多核巨细胞不是真正的瘤细胞,因在组织培养中,多核巨细胞在 2~3 周后死亡或经几次传代后消失,从未见有核分裂,这些培养的材料均来自各级的 GCT,因此多核巨细胞是一终末性细胞。真正的瘤细胞是基质细胞,对基质细胞的发生学皆有不同的意见。Goldring<sup>[3]</sup>等认为纤维母细胞样基质细胞是真正瘤细胞,因在原代培养中巨噬细胞样基质细胞可占 10%~40%,经不断传代后逐渐减少至 5%以下,而剩下的瘤细胞具有合成 I 型或 II 型胶原蛋白的能力,这是纤维母细胞或间叶细胞的特点。但 Komiya<sup>[4]</sup>等则认为单核巨噬细胞是基质细胞的主要来源,应用较敏感的单核细胞抗原的抗体(MCS-2, H-14)是培养的基质细胞 100%呈阳性反应,且这些细胞具有抗酒石酸性磷酸酶及有降钙素受体,与破骨细胞相似,故认为基质细胞是多核巨细胞的前身。

我们的研究表明,基质细胞有两种,在组织培养中形态较多为梭形细胞,与未分化间叶细胞或纤维母细胞相似,但亦有多边形或类圆形细胞,则与巨噬细胞相似。电镜下瘤细胞也分为间叶性基质细胞及巨噬细胞样基质细胞两类及其不同发育阶段。Komiya<sup>[4]</sup>培养的细胞没有说明是经过长期培养的,故很有可能是短期培养的,因而巨噬细胞标记仍很明显。我们两例经长期培养见基质细胞的巨噬细胞抗原表达丧失,免疫组化上仅呈 Vm 阳性反应,因此说明此时剩下的仅为间叶细

胞样基质细胞,并以后逐渐老化而消失,未能形成细胞株,因而考虑这两种基质细胞在肿瘤组织内是相互依存的,巨噬细胞样基质细胞在一般体外培养难长期存活而间叶细胞样基质细胞在没有巨噬细胞样基质细胞时也难于继续生存,除非发生突变而转化为恶性细胞(Ⅲ级GCT)。冯传汉<sup>[5]</sup>等1例培养625d最后也不能形成细胞株,Ischii<sup>[6]</sup>等宣称培养成功2例GCT细胞株(G1及G2),但动物接种后瘤细胞产生骨质及软骨,这不符合GCT的特性,故不是本瘤的细胞株。由于本瘤动物接种的致瘤性是十分低和弱的,形成瘤结最后也被机化而消失,加之染色体组型及亚二倍体多见,很少见三倍体或四倍体,这些说明本瘤是良性或低度恶性的肿瘤。

我们的免疫组化结果表明<sup>[7]</sup>,基质细胞对各种巨噬细胞抗体反应呈多态性,因在同一组织块切片中,仅部分基质细胞对每一种巨噬细胞抗体呈阳性反应。这可能反映瘤细胞不同发育的阶段,也可能说明瘤细胞是异质性的群体。溶菌酶是成熟巨噬细胞抗原,在Ⅲ级GCT阴性则说明瘤细胞是低分化而不成熟的。M718在基质细胞及多核巨细胞均呈阳性反应,说明两者有此共同抗原。我们还发现部分基质细胞对S-100反应阳性,在文献中尚未见报道,说明这些细胞可能是特异的巨噬细胞或是树突状网细胞,参与肿瘤的免疫反应,其真正意义尚有待于进一步研究<sup>[8]</sup>。

破骨细胞样的多核巨细胞是如何参与及形成本瘤的成分也不清楚,一些资料提示基质细胞分泌一些因子能吸引血中破骨细胞前身的单核细胞进入瘤组织内,并促进其发育及形成多核巨细胞<sup>[4]</sup>。目前已知维生素D<sub>3</sub>, PGE<sub>2</sub>, EGF, TGF- $\alpha$ , IL-1及TGF- $\beta$ 都可促进破骨细胞前身分化为多核的破骨细胞<sup>[10]</sup>,故阐明GCT基质细胞分泌这些细胞因子是目前急需研究的课题。这可推测在Ⅲ级GCT

时恶变的基质细胞分化差,分泌的细胞素少,故多核巨细胞少见,与此相反在I级GCT时则较多见。

(本文图见插页1)

### 参 考 文 献

- 1 李瑞宗. 骨巨细胞瘤. 刘子君主编. 骨关节病理学. 北京:人民卫生出版社,1992,224~235
- 2 刘子君,罗天锡. 骨巨细胞瘤的超微结构. 中华骨科杂志,1982,2:205
- 3 Goldring SR, Roelke MS, Petrisson KK, et al. Human giant cell tumor of bone: Identification and characterization of cell types. J Clin Invest, 1987, 79:483
- 4 Komiya S, Sasayuri F, Inove A, et al. Characterization of cells culture from giant-cell tumor of bone. Clin Orthop Rel Res, 1990, 258:304
- 5 冯传汉,张嘉庆,蔡玉辉.等. 骨巨细胞瘤长期体外培养观察. 北京医学院学报,1980,12:79
- 6 Ischii S, Tissue culture studies in human giant cell tumor and osteosarcoma. Internat Orthop, 1978, 2:77
- 7 刘子君,吉重敏,王连唐. Giant cell tumor of bone: An immunohistochemical study. Path Res Pract, 1989, 185:448
- 8 Takahashi K, Isobe T, Ohtsvki Y, et al. Immunohistochemical localization and distribution of S-100 protein in the human lymphoreticular system. Am J Path, 1984, 116:497
- 9 Sasaguri F, Komiya S, Sugama K, et al. Production of matrix metalloproteinase 2 and 3 (stromalysin) by stromal cells of giant cell tumor of bone. Am J Path, 1992, 141:611
- 10 Veses G; Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. A review of recent developments information, activation and mode of action of osteoclast. Clin Orthop Rel Res, 1988, 231:239

(1993-06-25 收稿 1994-07-28 修回)

