

人骨肉瘤组织诱发大鼠异位 骨质形成的观察^①

文剑明^② 张 萌 梁凤英 董书堃

(中山医科大学病理学教研室,广州,510089)

提 要 用 HE、碱性磷酸酶组化、骨粘连蛋白免疫组化及 X 线照相等方法观察 6 例人骨肉瘤冻干瘤组织引起大鼠背部肌肉异位骨质形成。结果表明,冻干骨肉瘤组织埋入大鼠背部肌肉 3~5 周,均可引起局部组织形成小梁状或片块状骨样组织,其中小梁状骨样组织边缘可见骨粘连蛋白线状阳性反应,部分骨样组织出现钙化。在骨样组织形成区内有大量碱性磷酸酶阳性细胞。X 线显示植入部位密度增高。综合文献报道,骨肉瘤组织诱发异位骨质形成可归因于瘤组织中含有骨形态形成蛋白(BMP)。本研究结果为解释骨肉瘤病变部位肿瘤性骨质形成原因提供动物实验依据。

关键词 骨肉瘤;大鼠;体内实验;异位骨质形成;免疫组化;组织化学;X 线

中图分类号 R738.1

骨肉瘤是引起局部病变部位骨质形成的代表性骨肿瘤。骨肉瘤引起的骨质形成可能是由于瘤细胞中含有骨形态形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)^[1],但目前还未见有关植入骨肉瘤组织引起异位骨质形成的报道。本研究将从临床获得的人骨肉瘤组织冻干,埋入大鼠背部肌肉,用组织学、组织化学、免疫组化和 X 线等方法观察异位骨质形成的情况,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 标本来源

从临床获 6 例骨肉瘤手术切除标本。将瘤组织剪成约 0.1g 的组织块,放入真空中置 4℃冰箱至组织块完全干燥,约需 24h。将冻干的组织块取出放 -20℃冰箱保存备用。余下的组织作常规病理切片检查,以确定诊断。

1.2 动物实验

Wistar 大鼠由本校动物中心提供,雄雌不分,体重 70 g 左右。将上述冻干的瘤组织

植入背部肌肉。另植入冻干的 4 月龄人胚骨髓间质细胞(第 20 代)团块作对照。植入后第 3、4、5 周解剖大鼠,取出植入部位组织,作如下处理。

1.3 酶组化染色

将植块用冰冻切片机制片,厚 4 μm。用 -20℃冷丙酮固定 15 min 后进行碱性磷酸酶组化染色。染色方法为 α-萘基磷酸法^[2]。

1.4 免疫组化染色

组织用中性福尔马林固定 24 h。常规石蜡包埋,切片厚 4 μm。涂胶贴片,经脱蜡后进行骨粘连蛋白(Osteonectin,病理教研室刘子君教授惠赠)免疫组化 ABC 染色, DAB 显色,中性树胶封片。

1.5 X 线检查

大鼠接种冻干瘤组织块后第 3、4、5 周,解剖取走胸腔脏器组织和皮肤,只保留植块结节和后胸廓,置 X 线下照片。

2 结 果

① 本研究由国家自然科学基金(39270296)和国家教委留学回国人员基金资助;
② 第一作者 40 岁,男,副教授

2.1 骨肉瘤患者的临床与实验

结果见附表。

诱导性异位骨质形成实验的临床资料和

附表 6例骨肉瘤患者临床资料与大鼠接种实验结果

病例	性别	年龄	肿瘤部位	植入周数	骨样组织	X线照相(周数)	骨粘连蛋白
1	女	16	股骨	3,4,5	片块状	未见异常(3)	未测
2	男	28	胫骨	4,5	小梁状	未见异常(3)	骨样组织边缘
3	男	14	胫骨	3,5	小梁状	灶性密度增加(4)	骨样组织边缘
4	女	16	胫骨	3,4,5	小梁状	灶性密度增加(5)	阴性
5	男	10	腓骨	4,5	片块和小梁状	灶性密度增加(4)	骨样组织边缘
6	男	18	胫骨	4,5	片块状	灶性密度增加(4)	骨样组织边缘

2.2 局部与X线所见

6例人骨肉瘤冻干瘤组织植入大鼠背部肌肉3周后,在植入部位形成直径约0.3~0.8 cm大小,白色半透明结节,质实。X线照片显示,植入4周以上的病例(4例)可见结节部位密度增加(图1),而植入3周者(2例)未见明显改变。

2.3 HE切片所见

HE切片见植入部位形成骨样组织,其中3例骨样组织呈小梁状排列,中央部位呈不同程度钙化(图2)。紧靠骨样组织的旁边,有

为数不多的梭形或多角形骨母细胞样细胞,但不成排排列。一些细胞则已陷入骨样组织中,似骨细胞,并有明显的陷窝形成。另3例形成的骨样组织呈片块状(图3),其中见明显位于骨陷窝的骨细胞,中间部也有不同程度的钙化。骨样组织的外围为纤维结缔组织,纤维母细胞增生活跃,并逐渐过渡成为位于骨样组织旁的骨母细胞。所形成的异位骨样组织随时间延长(第4、5周),钙化有增多的趋势。

6例植入组织部位均未见任何瘤细胞存活的迹象。



图1 诱导性异位骨质的X线图象

人骨肉瘤冻干组织植入大鼠背部肌肉3周,X线可见植入部位致密阴影(箭头),其密度相似于骨组织

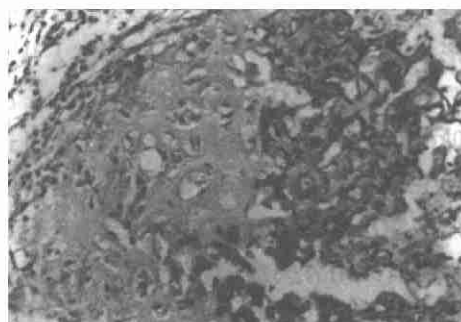


图2 诱导性异位骨质的组织形态

人骨肉瘤冻干组织植入大鼠背部肌肉3周诱发的异位骨样组织和钙化,形态相似于骨小梁,HE 10×

2.4 碱性磷酸酶染色所见

碱性磷酸酶染色在6例植入组织中均可见骨样组织形成区及周围有散在分布的碱性磷酸酶阳性细胞。这些细胞为多角形,以植入第3周为最多(图4),随时间增长逐渐减少,第

5周时只有少数阳性细胞存在。

2.5 骨粘连蛋白染色所见

骨粘连蛋白染色仅见部分骨样组织边缘呈线状阳性反应,少数位于骨小梁旁的骨母细胞样细胞也呈阳性反应。

对照组在植入部位见纤维结缔组织增

生,伴炎症细胞浸润,未见骨样组织形成。

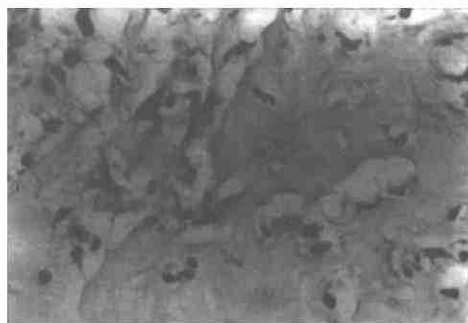


图3 诱导性异位骨质的组织形态

人骨肉瘤冻干组织植入大鼠背部肌肉3周诱发的异位骨样组织和钙化,形态为片块状。HE 10×

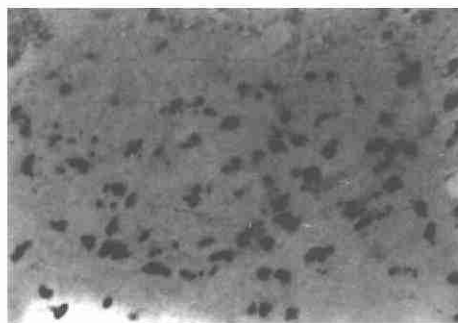


图4 骨样组织碱性磷酸酶染色

异位骨样组织形成区可见大量碱性磷酸酶阳性细胞。组织化学染色。10×

3 讨 论

本世纪70年代,不少研究揭示如将去矿化骨质植入动物肌肉组织内,可诱发局部异位骨质形成,说明骨中有一种生长和分化因子,能使局部间叶细胞向骨母细胞转化^[3]。80年代,骨中的分化活性因子被抽提出来,随后被提纯,命名为成骨素(osteogenin)或骨形态形成蛋白(BMP)^[4,5]。Bessho^[6]等人从人牙基质中提纯BMP,测出分子量为19 842u(20kd),含191个氨基酸。至今,已有报道用分子克隆法提纯人重组BMP^[7]和用单克隆抗体检测出骨肉瘤细胞胞浆内含有BMP^[8]。但未见有人用骨肉瘤组织诱导大鼠异位骨质形成的报道。

本研究用6例人骨肉瘤冻干瘤组织埋入大鼠背部肌肉组织内,均能诱导异位骨质形成,所形成的骨样组织呈小梁状或片块状,但在周围未见有正常骨质形成时典型成排排列的骨母细胞。用酶组化染色时,在骨样组织形成区内有大量碱性磷酸酶阳性细胞,提示这些细胞相似于骨母细胞(碱性磷酸酶是骨母细胞标志酶),在骨样组织合成中起关键作用。在异位骨质形成区周围还可见间叶性纤维母细胞增生,并移行成骨母细胞样细胞,合

成骨样组织。可以认为,冻干后的骨肉瘤瘤组织细胞已死亡,但其所含的BMP仍保持活性。大鼠肌肉内多潜能的间充质细胞受冻干瘤组织中缓慢释放的BMP诱导,分化形成具有成骨作用的细胞,分泌骨胶原和骨粘连蛋白,形成骨样组织并钙化。这种诱导性异位成骨与膜内成骨过程相似。骨粘连蛋白主要位于骨小梁样骨样组织边缘,参与钙离子与骨胶原成份的分子交联和沉积。

本研究结果,可为解释骨肉瘤病变部位肿瘤性骨质形成原因提供动物实验依据。

参 考 文 献

- 1 Takaska K, Yoshikawa H, Masuhara K, et al. Establishment of a cell line producing bone morphogenetic protein from a human osteosarcoma. Clin Orthop, 1989,244:258
- 2 凌启波,实用病理特殊染色和组化技术.广州:广东高等教育出版社,1989.250~252
- 3 Reddi AH, Huggins CB. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. Proc Natl Acad Sci USA, 1972,69:1601
- 4 Luyten FP, Cunningham NS, Ma S, et al. Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. J Biol Chem, 1989,164:13377

- 5 Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al. Novel regulators of bone formation; molecular clones and activities. *Sciences*, 1988,242:1528
 - 6 Bessho K, Tamaka N, Matsumoto J, et al. Human dentin-matrix derived bone morphogenetic protein. *J Dent Res*, 1991,70:171
 - 7 Vishwas M, Harmonds RG, Reddi AH, et al. Identification and characterization of cellular binding proteins (receptors) for recombinant human bone morphogenetic protein 2B, an initiator of bone differentiation cascade. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991,88:3397
 - 8 Jin Y, Yang LJ. The relationship between bone morphogenetic protein and neoplastic bone diseases. *Clin Orthop*, 1990, 259:233
- (1993-03-23收稿 1993-12-10修回)

THE OBSERVATION OF HETEROTOPIC BONE FORMATION OF RAT INDUCED BY LYOPHILIZED TUMOR TISSUES OF HUMAN OSTEOSARCOMA

Wen Jianming Zhang Meng Liang Fengying Dong Shukun

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

Heterotopic bone formation in dorsal muscles of Wistar rats was induced by 6 lyophilized tumor tissues of osteosarcoma and observed by HE, histochemical staining of alkaline phosphatase, immunohistochemical staining of osteonectin and X-ray. The results showed that in 3 to 5 weeks after implantation of lyophilized tumor tissues, a trabecular or massive osteoid tissue could be seen microscopically in dorsal muscles of rats. The marginal area of the trabecular osteoid tissues showed a positive reaction of osteonectin. Some osteoid tissues become calcified. There were a number of alkaline phosphatase positive cells in the area of osteoid tissue. An increased density in the implanted sites of lyophilized tumor tissues. In summary, the induced heterotopic bone formation could be attributed to the bone morphogenetic protein in the tumor cells of osteosarcoma. These results provide a evidence of animal experiment to explain the cause of tumor bone formation in human osteosarcoma.

Key words osteosarcoma; rat; experiment in vivo; heterotopic bone formation; immunohistochemistry; histochemistry; X-ray