

大鼠骨肉瘤细胞吸收骨质实验 模型的建立与应用初探

徐栋梁* 丘钜世 刘子君

(病理学教研室)

提 要 采用液体闪烁计数、光镜、电镜等技术,分别研究骨肉瘤细胞-骨培养体系中的骨代谢和形态变化,建立了骨肉瘤细胞吸收骨质的体外实验模型,应用该模型证实了高浓度的羟乙二磷酸($P < 0.01$)、小鼠表皮生长因子($P < 0.05$)及骨肉瘤细胞培养基上清液($P < 0.05$)能促进骨质吸收;而低浓度羟乙二磷酸可保护骨质($P < 0.05$)。上述各组实验中,未见破骨细胞的增生性变化,但见骨肉瘤细胞的形态学变化,故认为骨肉瘤细胞可直接破坏骨质。

关键词 骨肿瘤;组织培养;闪烁计数;骨质吸收体外模型

中图分类号 R738.1; R361.3

骨原发肿瘤及转移瘤都必须先破坏骨质才能立足于骨内并进一步增生和扩展,但肿瘤破坏骨质的机制目前还不十分清楚。主要有两种看法:①间接作用:认为肿瘤细胞可通过激活破骨细胞而间接发挥其破坏骨的作用^[1];②直接作用:认为肿瘤细胞可直接引起骨质吸收不依赖破骨细胞的活动^[2,3]。为此,作者将预先用⁴⁵Ca²⁺标记的鼠颅盖骨与成株的大鼠骨肉瘤细胞一起培养,观察该培养体系内生物化学和形态学的动态变化及其影响因素,建立肿瘤细胞破坏骨质的体外实验模型,应用于探索破骨机制的研究。现将实验结果报告如下。

材料与方 法

材 料

1. 细胞株 Wistar 大鼠骨肉瘤细胞株,由山西省太原核辐射防治研究院提供。
2. 动物 昆明种小白鼠及 Wistar 大白鼠,由本校实验动物研究中心提供。
3. 培养基 RPMI_1640 培养基及 Eagle 基础培养基,均为美国 GIBCO 出品。
4. ⁴⁵Ca²⁺-CaCl₂ 北京原子能研究所出

品。

5. 小鼠表皮生长因子(mEGF) 美国 SIGMA 出品。

6. 羟乙二磷酸(EHDP) 商品名为 Didronel,加拿大 Norwich Eaton Pharmaceuticals Inc. 出品,主要成分为 1-Hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonic acid, 简称为 HEBP, 常称为 EHDP。

7. 其他 2,5-二苯基噁唑(简称 PPO) 和 1,4-双-[2'-(5'-苯基噁唑基)]苯(简称 POPOP),均为美国 SIGMA 产品,与二甲苯、乙醇等按比例配成闪烁液。

方 法

1. ⁴⁵Ca²⁺-CaCl₂ 标记骨的制备 选择活泼健康的新生小白鼠腹腔注射 2 μCi⁴⁵Ca²⁺-CaCl₂ 溶液,72 小时后处死;或选择怀孕第 18 天的大白鼠皮下注射 75 μCi⁴⁵Ca²⁺-CaCl₂ 溶液,24 小时后剖腹并从子宫取出胚胎鼠。无菌条件下取出新生小鼠或胚胎大鼠完整的颅盖骨, Hank 液中仔细分离颅盖骨两面的骨膜及结缔组织,沿矢状缝剪开颅盖骨,随机取其左或右侧骨作为实验组,另侧作为对照组。

2. 骨肉瘤细胞-颅盖骨培养体系 ①将不锈钢网剪成条,弯成“U”形架,洗净置

* 硕士研究生,现在附属第一医院中心实验室

24孔塑料培养板中一起用75%乙醇消毒备用。

②将实验组和对照组颅盖骨分别置相应各孔的不锈钢网架上,使骨凹面向上。③加入一定量培养液使骨片刚被其液面覆盖,培养24小时后弃去全部培养液再换一定量新鲜培养液与骨片凸面接触,但又不致浸泡整个骨片。④分组进行实验,第1部分:实验组骨与约10 000个骨肉瘤细胞共培养,对照组骨加等量同种培养液。均滴在骨凹面上。于第3、6、9、12天取培养液作液体闪烁计数检查 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 的脉冲数,并分别取出部分颅骨片,按常规作切片及超薄切片,但不进行脱钙,然后在光镜和电镜下观察。第2部分:实验组与对照组骨均分别加10 000个骨肉瘤细胞。实验组骨中分别加入高浓度、低浓度EHDP溶液、mEGF、骨肉瘤细胞培养上清液,对照组加等量培养液。第

3天均补充新鲜培养液,第5天检测培养液中 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 的脉冲数及骨肉瘤细胞和骨片的形态学变化。

结 果

液体闪烁计数

1. 骨肉瘤细胞破坏大、小鼠颅盖骨实验取一定量培养液做液体闪烁计数 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 脉冲数检测,其结果如表1。该表中的数据为脉冲数 $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$,后次比前次减少的例数为取出做光镜或电镜检查的骨片数。统计学方法应用 t 检验法。

2. 几种因素对大鼠骨肉瘤细胞破坏大鼠骨质的影响作用 检验方法同1,其结果见表2。

表1 骨质吸收过程中钙释放情况

骨源	测定时间	实验组脉冲数(n)	对照组脉冲数(n)	P
新 生 小 鼠	第3天	1 099.9 ± 227.2(45)	1 026.9 ± 250.0(45)	>0.05
	第6天	918.1 ± 132.7(40)	687.1 ± 122.6(40)	<0.05
	第9天	790.8 ± 125.1(36)	507.0 ± 101.9(36)	<0.05
	第12天	622.2 ± 116.8(32)	483.7 ± 128.0(32)	>0.05
胚 胎 大 鼠	第3天	2 118.7 ± 245.5(11)	1 925.3 ± 215.3(11)	>0.05
	第6天	1 297.4 ± 187.7(10)	1 060.8 ± 161.4(10)	<0.05
	第9天	963.5 ± 212.3(8)	707.2 ± 205.4(8)	<0.05
	第12天	691.7 ± 187.3(6)	616.4 ± 170.3(6)	>0.05

表2 几种因素对钙释放的影响

影响因素	实验组脉冲数(n)	对照组脉冲数(n)	P
高浓度EHDP	4 032.2 ± 157.9(6)	2 263.8 ± 217.2(6)	<0.001
低浓度EHDP	3 174.6 ± 289.3(6)	3 698.0 ± 311.6(6)	<0.05
mEGF	2 672.1 ± 121.5(6)	2 261.4 ± 114.6(6)	<0.05
骨肉瘤细胞 培养上清液	3 640.7 ± 126.2(6)	3 310 ± 117.3(6)	<0.05

光学显微镜检查

1. 培养过程对骨质的影响 经过培养液的体外培养后,颅盖骨在组织学与未经培养过的颅盖骨相比较,骨钙密度略下降,其他变

化较小。

2. 骨肉瘤细胞破坏骨质的动态观察 在体外培养过程中,骨肉瘤细胞破坏大小鼠颅盖的形态学改变是相似的。颅盖骨与骨肉瘤细胞

共培养第3天,可见骨肉瘤细胞呈1~3层粘附于颅骨,但骨的完整性及钙盐密度的改变尚不明显。第6天,可见骨片变薄,骨钙密度下降,甚至可见瘤细胞附着处的骨而呈锯齿状骨质缺损。第9天,可见骨片继续变薄,钙盐密度和骨有机基质密度均下降,肉瘤细胞粘附处呈局限性骨质缺损(图1),甚至穿孔。第12天,骨片严重破坏,被瘤细胞吸收而呈多孔状,孔径增大,部分区域只残存不完整的胶原纤维束,甚至全部由骨肉瘤细胞取代。骨质吸收的整个过程中,各实验组骨均未见破骨细胞的增生及功能活跃的表现。

3. 骨肉瘤细胞培养液上清液的影响 培养第5天,骨密度普遍下降,瘤细胞粘附处骨片变薄,可见呈凹陷状或锯齿状缺损,对照组病变轻。均未出现破骨细胞数量和形态学上的改变。

4. mEGF的影响 骨肉瘤细胞生长活跃,细胞层次多,可达5~6层,骨钙和胶原明显减少,可见锯齿状骨缺损,未见破骨细胞增生。

5. EHDP的影响 ①在高浓度EHDP作用下,肿瘤细胞生长极差,但骨钙严重减少,骨片完整性尚存,未见缺损性改变。②在低浓度EHDP作用下,肿瘤细胞生长较差,层次少,多为单层,单个独立粘附于骨片表面,骨片钙盐及完整性无明显变化。

电镜观察

颅盖骨与骨肉瘤细胞共培养第9天取骨作电镜观察,发现骨肉瘤细胞内细胞器丰富,多种形状的胞浆突起伸向骨表面及骨内部,细胞核移向较粗大的细胞突起根部,突起周围骨结构破坏,钙密度下降甚至消失,骨胶原纤维碎裂,最后溶解消失。越接近骨肉瘤细胞,骨钙和骨胶原的破坏越严重。单个或成群的瘤细胞侵入骨内部,呈“虫蚀样”骨质缺损,部分瘤细胞伸出突起包裹裂解后的骨屑,有些部位肉瘤细胞内有吞噬泡样结构(图2)。

讨 论

按照恶性肿瘤通过激活破骨细胞间接地吸

收骨质的说法,肿瘤细胞可释放激活破骨细胞的物质如破骨细胞活化因子(OAF)、前列腺素、甲状旁腺素等^[1],因而出现破骨细胞增生及功能活跃。但在本实验中,均未见破骨细胞的增生及参与,成骨谱系细胞亦未活跃生长,只有骨肉瘤细胞生长活跃,同时浸润吸收大量骨质,释放大量钙离子。故我们认识到在体外培养条件下骨肉瘤细胞可直接破坏骨质,而支持肿瘤细胞可直接吸收骨质的观点。电镜观察下,还发现骨肉瘤细胞浆突起伸入骨质进而呈围堤状包裹骨碎片,细胞胞浆内亦可见细胞膜包裹的骨碎片的结构,是否骨肉瘤细胞能像巨噬细胞吞噬异物那样,通过吞噬骨组织而达到吸收破坏骨质的作用,尚待研究。

本实验中,还可观察到骨肉瘤细胞破坏骨内部和骨表面的结缔组织,特别是胶原纤维。进入骨内部的骨肉瘤细胞其周围的胶原常裂解成碎片,最后均溶解消失。愈靠近瘤细胞,尤其是胞浆突起周围,胶原破坏愈严重。实验中增加肉瘤细胞培养上清液后促进骨质吸收作用,胶原的溶解显著增多,说明肉瘤细胞可能释放一些分解胶原的物质,如胶原酶等。有人也报道肿瘤浸润过程中电镜下可见瘤细胞周围出现I型胶原碎片^[4],许多肿瘤细胞中有胶原酶活性,^[5]从肿瘤细胞提取纯化的胶原酶具有降解胶原的能力。所以,我们认为骨肉瘤细胞可能像破骨细胞一样释放诸如胶原酶、溶酶体酶或其他蛋白溶解酶,破坏骨的有机与无机基质,逐步在骨内形成浸润灶。

Galasko等人^[5]发现EHDP等焦磷酸类似物能抑制肿瘤组织块条件培养基中的骨的钙盐溶解活性。Jung等^[6]将EHDP注入新生小鼠皮下,然后取其颅盖骨与肿瘤组织块条件培养基内培养,亦发现其骨质吸收被抑制。

Milch认为EHDP可被骨质转换活跃处的破骨细胞摄取,通过抑制破骨细胞的活性而抑制骨质吸收作用^[9]。但在本实验中,未见到破骨细胞参与骨质破坏活动,只见骨肉瘤细胞的生长明显受到抑制,如胞浆突起减少。所以,我们推测这时的骨质吸收的抑制现象可能

与 EHDP 抑制骨肉瘤细胞的活性而降低其破坏骨质的能力, 达到保护骨的作用。

但是, 长期大量使用 EHDP 可使人体硬组织去矿化, 甚至可引起骨折, 还可抑制骨和软骨的矿化。本实验使用高浓度的 EHDP 时, 虽然骨肉瘤的生长严重抑制, 但显著地促进了钙盐的溶解析出, 使骨质变疏松。这可能与 EHDP 的理化活性有关^[8], 其机制有待进一步探索。

Raisz 等^[9]报道了 mEGF 能直接促进培养中的胚胎大鼠长骨干的骨质吸收, 并显示该体系中胶原合成减少, 有人还发现 mEGF 引起培养中的新生小鼠颅骨的钙释放增加, 并认为这是其促进骨质吸收所致^[10]。在 mEGF 促进骨质吸收的过程中 OAF 没有增加, 经病理形态学检查后认为可能是 mEGF 直接刺激破骨细胞前体细胞的增殖^[9]。但本实验未见破骨细胞及其前体细胞增殖, 只见骨肉瘤细胞大量增殖。这种情况下出现的骨质吸收似乎与破骨细胞的关系不密切, 但是由 mEGF 的直接作用, 还是 mEGF 刺激了肉瘤细胞的作用, 或者是两者共同的作用, 尚待进一步研究。

通过对骨与骨肉瘤细胞共培养体系的动态观察, 结合其钙代谢变化与形态学改变, 取得了一系列重复性较好的数据及病理学图像, 并通过一些影响该培养体系代谢的因素对该体系进行验证研究, 建立了骨肉瘤细胞吸收骨质的体外实验模型, 通过初步应用, 作者认为具有可控性好, 检测方便, 应用广泛等特点。

(本文图见插页 2)

参 考 文 献

1. Mundy GR, et al. The mechanisms of

bone metastasis and bone destruction by tumor cells. in Weiss L and Harvey A ed. Bone Metastasis. Boston: Gibbert GK. Hall Medical Publishers, 1981:64~98

2. Mundy GR, et al. Big and little forms of osteoclast activity factor. *J Clin Invest* 1977;60:122
3. Eilon G, et al. Direct resorption of bone by human breast cancer cells in vitro. *Nature* 1978;276:726
4. Yamanishi Y, et al. Collagenolytic activity in malignant melanoma: physicochemical studies. *Cancer Res* 1973;33:2507
5. Galasko CSB, et al. The effect of prostaglandin synthesis inhibitors and diphosphorates on tumor-mediated osteolysis. *Br J Surg.* 1980;67:493
6. Jung A, et al. Inhibition by two diphosphorates of bone lysis in tumorconditioned media. *Cancer Res* 1981;41:323
7. Milch RA, et al. Response of bone to tumor invasion. *Cancer* 1950;9:340
8. Jowsey J, et al. The treatment of osteoporosis with disodium ethanel-hydroxy-1, 1-diphosphonate. *J Lab Clin Med* 1971;78:574
9. Raisz LG, et al. Direct stimulation of bone resorption by epidermal growth factor. *Endocrinology* 1980;107:270
10. Tashjian AH, et al. Epidermal growth factor stimulates prostaglandin production and bone resorption in cultured mouse calvaria. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;85:966

(1992-05-08收稿 1992-07-20 修回)

ESTABLISHING AND APPLIED STUDY OF IN VITRO MODEL OF BONE RESORPTION BY OSTEOSARCOMA CELL

Xu Dongliang Qiu Jushi Liu Zijun

(Department of Pathology)

In order to study the mechanism of osteosarcoma cell destructive of bones, the osteosarcoma cell-bone culture system, liquid scintillation counting, and light and electronic microscopy have been adopted by the authors. The changes in calcium metabolism and the pathology of the examined bones have been showed. In this way, the authors established an experimental model for the osteosarcoma cell destruction of calvaria bone of fetal rat and new-born mice and found that the damage to these bones could be increased with a high concentration of 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonic acid (HEBP, often called EHDP) ($P < 0.01$), the mouse epidermal growth factor (mEGF) ($P < 0.05$) or supernatant medium of the osteosarcoma cell ($P < 0.05$). The bones could be protected with a low concentration of EHDP ($P < 0.05$). In the above described groups of experiments, there was no proliferative activity of osteoclasts but morphological changes of osteosarcoma cells. So the authors maintain that the osteosarcoma cells could destroy the bones directly.

Key words bone neoplasm; tissue culture; scintillation counting; bone resorption; in vitro model

大鼠骨肉瘤细胞吸收骨质实验模型建立与应用初探 (正文见第38页)

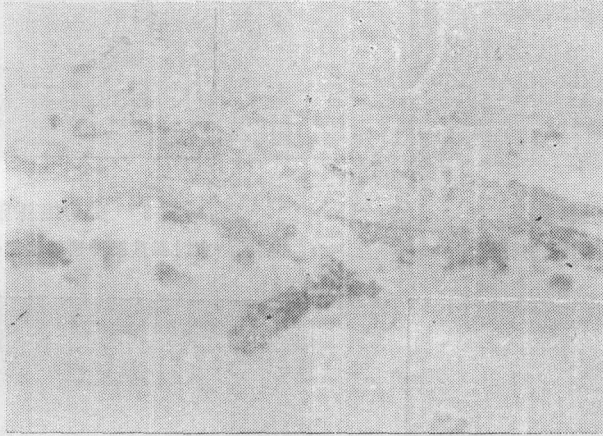


图1 骨肉瘤细胞破坏颅盖骨
共培养第9天,骨肉瘤细胞侵入组织内部,
导致局部骨质缺损,几近穿孔。 ×400

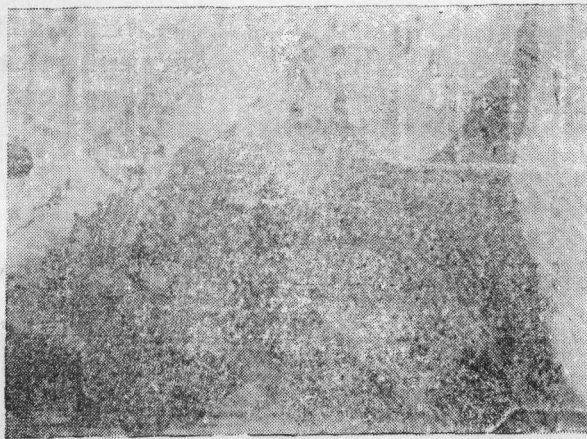


图2 骨肉瘤细胞吞噬体样结构
骨肉瘤细胞突起包绕骨碎片,其胞浆内存在着几个含有骨碎片的
吞噬体样结构。TEM ×7500