DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).1989.0050

人透明软骨抗OS-732细胞系浸润的研究

——细胞培养及透射电镜观察

范 莹* 刘子君

（病理解剖学教研室）

提 要 本文研究成骨肉瘤OS-732细胞系浸润软骨的机理，指出经盐酸胍处理后的软骨可被瘤细胞所浸润，这些浸润细胞在电镜下见其有生长、代谢旺盛的特点，提示正常软骨内含有抑制肿瘤细胞浸润的因子存在。

关键词 肿瘤浸润 微管及微粒 OS-732细胞系

透明软骨不易或几乎不被恶性肿瘤所侵犯[1]，目前发现透明软骨抗恶性肿瘤浸润似乎与其所含的，能被盐酸胍（GuHCl）所抽提的物质有关。但是，这些实验所用的软骨多为动物透明软骨，且在形态学上缺乏对肿瘤细胞内超微结构变化与肿瘤浸润间关系研究。Bracke[2]等的实验认为经 GuHCl 处理的透明软骨其抗肿瘤浸润能力与正常透明软骨并无不同。鉴于此，本文应用组织——细胞培养技术，并在电镜下观察 OS-732 人成骨肉瘤细胞系与人关节透明软骨共培养的结果。

材料与方法

1．培养液 Engle（美国 Derter 公司）、1640培养基（日本 Nissui 药剂公司）、小牛血清。以上各液消毒灭菌后分别以40%、40%和20%比例充分混合均匀，加1%青、链霉素，用 $NaHCO^3$ 调节 pH 值至7.2～7.4。

2．细胞 OS-732人成骨肉瘤细胞系北京积水潭医院建立；FB 取自引产胎儿肺组织成纤维细胞。

3．软骨 取材于本校附属医院及广东省人民医院骨科手术截肢之正常透明软骨。

4．其他试剂 0.25%胰蛋白酶（Difco 进口分装）、5M 盐酸胍（上海试剂二厂）、Hank 氏液（含5%青、链霉素）。

5．培养用器皿 不锈钢管（长1.2～1.5 cm，直径 0.5cm，内径 0.3cm，其一端为锋利切缘；不锈钢架；称量瓶；试管；离心管。

6．细胞器官培养系统 将取材软骨切成 0.1cm厚的薄片，用 Hank's 液冲洗。将软骨分为两部分，一部分立即与肿瘤细胞及成纤维细胞共培养（详见后），另一部分加入10倍体积的5M GuHCl，密封，放入4 ℃冰箱中抽提36～48小时。实验前取出，用培养液冲洗其表面残留的 GuHCl。

培养方法

用不锈钢管锋利切缘切割软骨，使软骨恰好完全封闭不锈钢管开口，放在不锈钢架上，然后一并放入称量瓶中。每个称量瓶中4～6个不锈钢管。

用胰蛋白酶消化 OS-732、FB 细胞均以 4×10^5个/ml浓度，分别接种至含软骨的不锈钢管中，密封称量瓶，将其放入37℃培养箱中。隔天向不锈钢管中加入新鲜培养液，培养7天。

7．电镜标本制备 常规电镜标本制备，半薄切片定位，超薄切片，H-600电镜观察。

结 果

1．经 5M GuHCl 抽提的透明软骨 其透明软骨基质内胶原纤维的排列及结构，蛋白多糖颗粒的分布均无改变。但软骨细胞核溶解呈空泡状，胞浆均质化。

2．与正常透明软骨共培养的细胞及软骨

（1）与正常透明软骨共培养的 FB FB细

* 研究生

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

胞在软骨表面排列 2 ～ 3 层。细胞长梭形，胞核小，染色质边集，胞浆内见较多游离核扩体及少量粗面内浆网。未见细胞浸润入软骨。

（2）与正常透明软骨共培养的 OS-732 细胞　瘤细胞在软骨表面生长成 3 ～ 5 层，细胞长梭形，核小，细长，胞浆内少数粗面内浆网及游离核扩体，线粒体及高尔基复合体，偶见微管，未见微丝（图 1，见封 2，下同）。未见肿瘤细胞浸润入软骨中。

3. 与经 5M GuHCl 抽提的透明软骨共培养的肿瘤细胞及软骨

（1）与经 5M GuHCl 抽提的透明软骨共培养的FB细胞及软骨 FB细胞在软骨表面排列 3 ～ 4 层，细胞形态与同正常透明软骨共培养者无显著差异。未见细胞浸润入软骨(图 2)。

（2）与经5M GuHCl 抽提软骨共培养的 OS-732 细胞及软骨 OS-732 细胞在软骨表面排列 3 ～ 5 层，细胞体积大、圆形、椭圆形或不规则形，核大而不规则，形成许多折叠，常染色质丰富，核仁大而明显，亦见核小体。肿瘤细胞胞浆内见大量游离核糖体、扩原颗粒、发育良好的粗面内浆网及高尔基复合体。与软骨相邻处的肿瘤细胞胞浆中及肿瘤细胞伸入软骨的胞浆突起处见大量线粒体，发育良好，体积较大，沿胞膜下单层排列。肿瘤细胞微管、微丝丰富，常排列在线粒体周围。尤其在细胞膜下线粒体与细胞膜间的胞浆中及肿瘤细胞伸入软骨的突起中，微管、微丝常大量聚集成束，并与该处细胞膜平行排列（图 3 ）。肿瘤细胞向软骨伸出许多大小形态不一的胞浆突起，呈垂直或斜向插入其内，并见部分甚至整个肿瘤细胞浸润埋入软骨内。

肿瘤浸润处的软骨基质，胶原纤维被破坏，胶原纤维断裂或消失，蛋白多扩颗粒消失，出现电子密度高的、大小不等形状不规则的块状物质（图 4 ）。

讨　论

本文培养系统对软骨并不造成机械压力，瘤细胞的生长也不受三维空间的限制。但与正常透明软骨及经 GuHCl 抽提软骨共培养的肿瘤细胞，其生长状态却有明显差异，提示在正常透明软骨表面的 OS-732 细胞生长及代谢状态低下。与正常透明软骨对其影响有关，而与经 GuHCl 抽提软骨共培养的肿瘤细胞生长活跃并浸润入软骨中，是由于经 GuHCl 抽提后透明软骨某些成分丢失，致对肿瘤细胞生长抑制丧失。

附表　两种细胞对软骨浸润性比较

细　胞	正常透明软骨	经 5MGuHCl 抽提软骨
FB	不能浸润(5)	不能浸润(6)
OS-732	不能浸润(10)	(1)伸出胞突部分肿瘤细胞浸润入软骨(4)整个肿瘤细胞浸润入软骨(5)

注：括号内数字为例次

Bribeck 和 Wheatly[3] 首先报道了电镜下在肿瘤浸润中有胶原纤维碎片出现，以后证实许多肿瘤细胞中有胶原酶的活性[4]，在肿瘤浸润带处胶原酶活性较肿瘤中心高[5]。经提取、纯化的胶原酶分别具有降解Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ型胶原的作用[6,7]，并可杀伤正常细胞，破坏细胞间连接，从而造成组织结构的破坏，使肿瘤细胞得以浸润。本文 OS-732细胞对经 GuHCl 抽提的透明软骨浸润中，破坏胶原纤维、浸润入软骨的 OS-732 细胞胞浆内有大量粗面内浆网、高尔基复合体等，因此推论，这些细胞有分泌蛋白质的能力。结合在软骨交界处的胞浆突起上有胞膜小凹出现，可能是肿瘤细胞分泌蛋白质的表现。由于此处可见胶原纤维的破坏，故考虑其分泌物很可能是胶原酶。Kuettner[8] 等发现人成骨肉瘤细胞中确有胶原酶活性，但没提出是破坏透明软骨Ⅱ型胶原的原因。本实验观察到胶原纤维的破坏应认为与 OS-732 细胞分泌的胶原酶有关。与正常透明软骨共培养的 OS-732细胞对照，后者产生分泌性蛋白质的细胞器减少，软骨中胶原纤维也没有破坏。

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

肿瘤细胞的运动对浸润过程起重要作用，这与胞浆收缩性蛋白质——微管、微丝有关，多见于肿瘤细胞浸润处的胞浆突起，或在体外培养中肿瘤细胞伸出的伪足中。本文看到浸润肿瘤细胞微管及微丝最早出现在胞浆突起处。浸润入软骨的深度越深，肿瘤细胞的微管、微丝也越多，完全浸润埋入软骨中的肿瘤细胞中可见大量微管及微丝。相反，与正常透明软骨共培养的 OS-732 细胞微管及微丝很少见。Kuettner[10] 等用 GuHCl 从牛透明软骨抽提出一种物质，能影响肿瘤细胞的伸展及运动，但并未说明原因。我们认为可能是这些物质影响肿瘤细胞内的微管及微丝，从而使肿瘤细胞失去运动的能力。

参 考 文 献

[1] Kuettner KE, et al. Morphological studies on the resistance of cartilage to invasion by osteosarcoma cell in vitro and vivo. Cancer Res 1978; 36:277.

[2] Bracke ME, et al. Interation of malignant cells with salt-extracted cartilage in vitro. Cancer Res 1984; 44:297.

[3] Bribeck MSC, et al. Polarity of actin at the leading eag of cultured cell. Cancer Res 1965; 25:590.

[4] Yamanshi Y, et al. Collagenalytic activity in malignant melanoma physiochemical studies. Cancer Res 1973; 33:2507.

[5] Strauch L, In "Tissue intractions in carcinogenesis". Acad. Press. New York, Tarin D (ed). 1972:399-433.

[6] Hayman EG, et al. Codistribution of haparan sulfate proteoglycan, laminin, and fibronection in the extracellular matrix of normal rat kidney cells and their coodinate absence in transformed cells. J Cell Biol 1982; 284:28.

[7] Liotta LA. et al. Role of collagenasis in tumor cell invasion. Cancer Metas Rev 1982; 1:277.

[8] Pauli BU, et al. Regulation of tumor invasion by cartilage-derived anti-invasion factor in vitro. JNCI 1981; 67:65.

[9] Carr I, et al. The fine structure of nesoplastic: invasion of liver, skeletal mucle and lymphatic vessels by the Rd/3 tumor. J Pathol 1976; 118:91.

[10] Kuettner KE, et al. In "Bone metastasis". Boston: weiss L. and Gilbert HA. 1981; 131-165.

Human Hyaline Cartilage Inhibition of OS-732 Cell Line Invasion in vitro

Fan Ying Liu Zijun

(Department of Pathology)

Abstract

The anti-invasive ability of cartilage was investigated in human hyaline cartilage co-cultured with OS-732 human osteosarcoma cell line. Invasive osteosarcoma cells were unable to invade normal hyaline cartilage after 7-day co-culture. Observation of TEM showed that the growth and metabolism of tumor cells were inhibited by co-cultured cartilage. However, cartilage extracted with 5M GuHCl was invaded by tumor cells. In this situation, tumor cells indicated a high growth and metabolic status and contained abundant microtubules, microfilaments, rough endoplasmic reticulum, mitochondria and Golgi bodies. Cartilage matrix collagenous protein(CMCP), from extracted cartilage, was denatured and became more electron dense. In the control group, normal fibroblasts did not invade cartilage or extracted cartilage and its growth and metabolism did not inhibit by cartilage. Our report shows that resistance of hyaline cartilage to tumor invasion could be regulated in part by salt-derived materials which may inhibit the growth, metabolism and locomotion of tumor cells.

Key words Tumor invasion Microtubule and microfilament OS-732CellLine

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

人透明软骨抗 OS-732 细胞系浸润的研究——细胞培养及透射电镜观察 （正文见第21页）

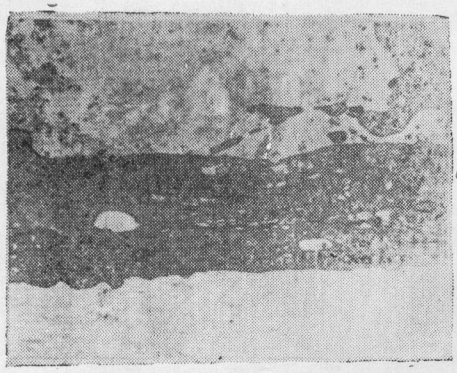


图 1 与正常人关节透明软骨共培养的05772细胞，细胞长梭形，胞浆内有少许粗面内浆网及游离核糖体，线粒体及高尔基复合体，偶见微管，未见微丝，细胞未浸润软骨，软骨结构无破坏

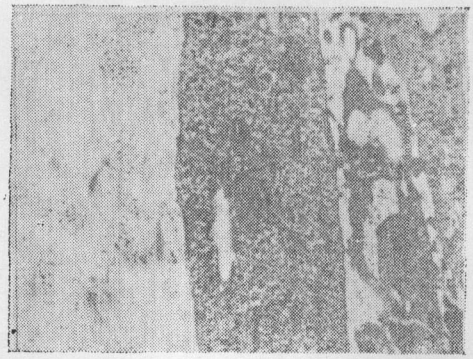


图 2 与经 MGuHCL 抽提的软骨共培养的 FB，与同正常透明软骨共培养者无明显差异，细胞也未浸润入软骨中，软骨结构无破坏

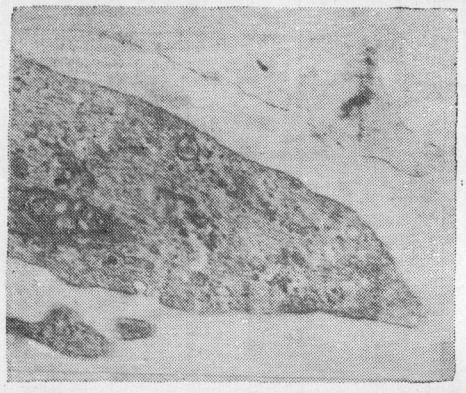


图 3 微管大量出现于 OS-732 细胞插入经 5MGu-HCL 抽提的软骨中的胞突内，此处尚可见肿瘤细胞膜小凹，并有软骨基质破坏

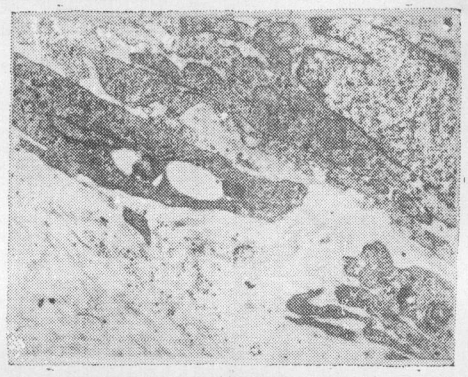


图 4 被OS-732细胞浸润的软骨基质中，胶原纤维断裂，蛋白多糖颗粒消失，基质中出现块状电子密度高的物质

※ ※ ※ ※

各类麻风皮损内 T 细胞亚群的研究 （正文见第24页）

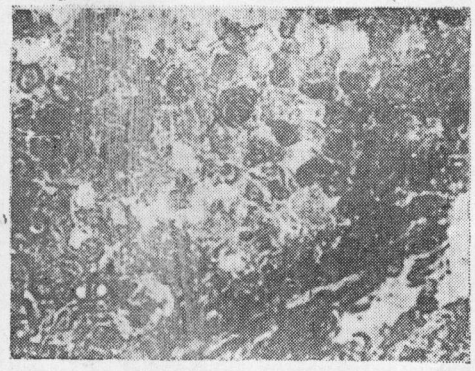


图 1 TT 型 OKT4 细胞分布在肉芽肿内及其外围部 ACC 免疫酶标法×480

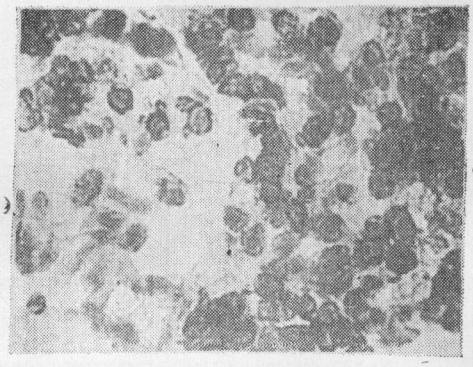


图 2 TT 型 OKT8 细胞主要分布在肉芽肿的外围部 ABC 免疫酶标法×480

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net