DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.06.022

人骨肉瘤细胞浸润转移相关表型的研究

刘 光* 高奉浔 王 东 冯素珍** (第三军医大学附属大坪医院病理科) 重庆, 400042

提 要 目的: 提高对骨肉瘤免疫表型特别是浸润转移相关表型的认识及揭示骨肉瘤高转移率的部分有关可能机理,为临床提供有可能成为评价骨肉瘤患者预后的新的参考指标。方法: 采用免疫细胞化学方法检测 OS-732细胞系 10种与转移相关的抗原表达。结果: 该细胞系除 p53-Pab1801染色为阴性外,其它9项均为阳性。结论: 两种基质降解酶-Cath-D和 MMP-2的阳性表达,推测它们对骨肉瘤的浸润转移有一定的促进作用,并可能成为骨肉瘤的两个转移表型: p53-DO1和 p53-Pab240蛋白的阳性表达间接说明 p53基因突变的可能,不仅进一步验证骨肉瘤中 p53突变的发生率高,而且综合 PCNA的强阳性、BMP和上述两种酶的阳性表达,推测本细胞系具有较高的浸润能力和转移潜能,为进一步探讨骨肉瘤的高转移机理提供了一定的实验基础。

关键词 骨肿瘤;骨肉瘤;浸润;转移;免疫表型;预后
中图法分类号 R738.1

骨肉瘤(Osteosarcoma, OS)是最常见的骨原发性恶性肿瘤,由于恶性程度及转移率高,其远处转移是治疗失败和病人死亡的主要原因。对骨肉瘤的研究,因受其发病率低等因素的影响,在临床上很难建立新的诊断或治疗方法[1]。本实验利用对人骨肉瘤细胞系与浸润转移相关免疫表型物征的研究,旨在对人骨肉瘤细胞免疫表型做进一步探讨和补充,以提高人们对骨肉瘤免疫表型特别是浸润转移相关表型的认识和揭示骨肉瘤高转移率的部分有关可能机理,从而为临床提供有可能成为评价骨肉瘤患者预后新的参考指标。

1 材料和方法

1.1 细胞系和细胞培养

人骨肉瘤细胞系 OS-732,购自北京积水潭医院免疫研究室,病理组织学分型为骨母细胞型[2]。细胞培养于含 10%新生小牛血清(NBCS,经 56℃、30 min水浴灭活) RPMI-1640(GIBCO公司)培养基中。37℃、5% CO_2 饱和湿度下,孵箱内培养。

1.2 细胞标本的制备

将呈指数生长的细胞以 0.25%胰蛋白酶和 0.02% EDTA-Na2 1∶1混合液消化并制成悬液(细胞数为 1×10⁵个/ml);将其加入事先已放入小盖玻片的24孔培养板(0.4 ml/孔),同上条件培养 48 h取出,小盖玻片用 Hanks液洗 3次,冷丙酮(4℃)固定 5 min,干燥后置-30℃冰箱备用。

1.3 抗体

一抗10种。其中,MMP-2由美国 NIH国家癌症研究中心(NCI) Liotta实验室 Dr. W. Stetler-Stevenson惠赠,为兔抗人 MMP-2血清冻干品(1∶450稀释),对 MMP-9(92-kDa Ⅳ型胶原酶)无交叉反应。p53-PAb1801由英国 ICRF分子免疫组化实验室 Dr. L. Crawford惠赠,为培养细胞上清液(1∶50稀释),与人野生型和突变型 p53蛋白均起反应; p53-PAb240由英国 Dundee大学 Dr. D. Lane惠赠,为培养细胞上清液(1∶50稀释),与人及多种动物突变型 p53蛋白起特异性反应。骨形态发生蛋白(BMP 1∶200)购自第四军医大学;单抗 nm23-H1(1∶20)、p53-DO1(1∶500)和多抗 p16(1∶50)为 Santa Cruz公司产品;单抗 CEA(1∶100)及多抗:组织蛋白酶-D(cath-D1∶100)和 S-P试剂盒均为 Zymed公司产品;增殖细胞核抗原(PCNA 1∶100)为 Dako公司产品。

1.4 免疫细胞化学染色

主要步骤如下:① 1% Triton X-100 PBS漂洗 3次;② 10%正常山羊血清-PBS 37℃孵育 15 min;③一抗(阴性对照,用 PBS代替),4℃冰箱过夜;④生物素化二抗(1∶200), 37℃孵育 15 min;⑤ 0.3% H_2O_2-PBS室温孵育 5 min;⑥链菌素亲生物素酶复合物(1∶200), 37℃孵育 15 min;⑦ DAB-H_2O_2显色,室温,约 10 min;⑧常规复染。

1.5 结果判断

阳性反应以细胞内出现棕黄色颗粒为判断标准。光镜下每张玻片随机选择 10个中倍视野(MPF)观察,计算阳性细胞数并结合染色深浅,分为3组:强阳性(++),阳性细胞在 60%以上,染色较深,可见较多粗颗粒;弱阳性(+),阳性细胞数在 10%~60%,染色中等,可见较多细颗粒;阴性(-),阳性细胞数在 10%以下。

* 刘 光,男,36岁,主治医师,硕士,现在北京军区总医院病理科 北京, 100700
** 创伤科

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 结果

结果显示: (+ +)有 p16、Cath-D、p53-D01和 PCNA; (+)有 p53-PAb240、MMP-2、nm23-H1、BMP和 CEA; (-)有 p53-PAb1801其中表达部位类型, p16以核膜及核周胞质染色为主,部分胞核可见散在棕黄色颗粒,见见图 1; p53-D01以胞核及核膜染色为主,部分胞质着色较淡,见图 2,而 p53-PAb240则以胞质染色为主; MMP-2、Cath-D、nm23-H1、BMP和 CEA仅见胞质内表达,见图 3、4; PCNA胞核表达。

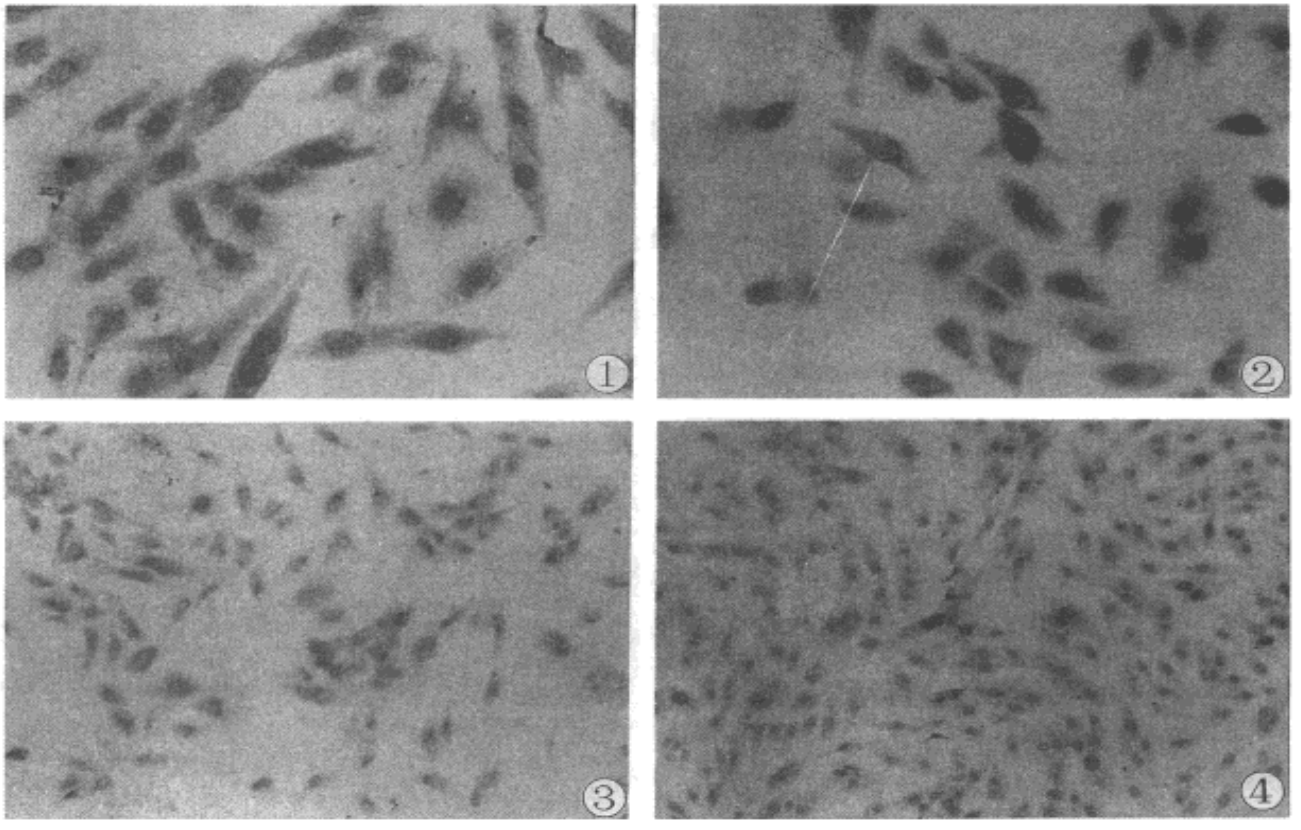


图 1 P16蛋白免疫组织化学染色 (SP× 400)

Fig 1 Immunohistochemical staining with P16 protein (SP× 400)

图 2 p53-D01免疫组织化学染色 (SP× 400)

Fig 2 Immunohistochemical staining with P53-DO1 (SP× 400)

图 3 MMP-2免疫组织化学染色 (SP× 400)

Fig 3 Immunohistochemical staining with MMP-2 (SP× 400)

图 4 nm23-H1免疫组织化学染色 (SP× 400)

Fig 4 Immunohistochemical staining with nm23-H1 (SP× 400)

3 讨论

3.1 抑癌基因产物

p53基因编码 53-kDa核磷酸蛋白,即 p53蛋白,该蛋白能与序列特异性 DNA结合调控正常细胞的生长。近年来,有关 p53与骨肉瘤预后的研究较多, Toguchida等[3]在 76例骨肉瘤中发现 18例 p53基因重排和 14例点突变,而 48%的 p53基因突变骨肉瘤在 2年左右出现肺转移;一般认为,免疫细胞化学方法检出 p53蛋白,可间接反映 p53基因的突变。王东等[4]研究 50例骨肉瘤,发现 p53蛋白的表达与预后呈负相关。本实验结果显示: D01强阳性表达,表明 OS-732有 p53蛋白的聚集,而 PAb240阳性进一步说明聚集的 p53蛋白可能为突变型或部分为突变型,并推测有 p53基因的突变; PAb1801显阴性可能与所识别抗原决定簇不同有关, PAb240为第 156~ 214氨基酸,正处在 p53基因 6个突变热点之一(第 175位氨基酸), D01为第 1~ 45位

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

氨基酸,而 PAb1801为第 32~ 73位氨基酸。本细胞系 p53的表达定位类型,PAb240以胞质内主,D01亦显胞质内染色,而一般认为其表达位于细胞核或以细胞核表达为主。有资料显示,在冰冻切片及细胞涂片上,p53较易出现在胞质内[5],也有人认为野生型和突变型 p53蛋白均可出现在胞核内,而突变型则能出现于胞质内[6],所以出现于胞质内则表示这种 p53蛋白为突变型[7],其原因尚不清楚。总之,从以上结果又可进一步证实 p53基因的突变与本瘤的发生和发展存在一定的关系以及提示本细胞系具有一定的转移潜能。

多肿瘤抑制基因(MTS1)是新近发现的抑癌基因,位于人第 9号染色体短臂(9p21)上,其编码为一种 15-kDa蛋白,即 p16蛋白。它能特异性结合细胞周期素依赖性激酶 4(cdk4)并抑制其活性,cdk4和周期素 D可以形成复合物促进细胞从 G1期进入 S期,从而促进细胞的增生,并可能是肿瘤发生的主要因素;所以,p16蛋白能抑制细胞的增殖和恶性转化。研究发现,75%的癌细胞系 p16基因缺失或突变[8]。本实验显示,OS-732细胞 p16蛋白表达呈强阳性,间接反映 p16基因未缺失,其细胞内表达类型以胞质为主。有作者对肺癌组织中 p16蛋白细胞内定位进行了研究,发现癌细胞染色部位主要分布于细胞浆,而正常细胞则定位于细胞核;据此推断本细胞系中 p16蛋白可能属异常表达,但其真正原因及意义有待进一步研究确定。

nm23是由 Steeg等 1988年首先从小鼠黑色素瘤 K-1735细胞系中分离出的具有转移调节能力的近年来最令人注目的转移抑制基因。人基因组中存在两个 nm23基因,可分别编码核苷二磷酸激酶(NDPK)的 A和 B两个亚基,此酶与微管的聚合和生成、G蛋白介导的信号传递有关,从而影响癌转移[9]。本实验结果表明,nm23-H1蛋白在 OS-732细胞系中显阳性表达,间接推测 nm23-H1基因的存在或未缺失。nm23与骨肉瘤转移和预后的关系,尚未见报道。

3.2　基质降解酶类

大量实验证实,肿瘤细胞表达基质降解酶的水平与肿瘤细胞浸润转移潜能有关。Ⅳ型胶原酶和 Cath-D是与肿瘤浸润转移相关的两种主要的基质降解酶,前者在对骨肉瘤细胞的研究中近年已有报道,后者主要与乳腺癌、结肠癌等浸润转移有关。实验结果显示,MMP-2、Cath-D在 OS-732细胞中均为阳性表达,表明两种酶均存在于骨肉瘤细胞。由此推测这两种酶可能参与骨肉瘤浸润转移过程中的基质降解,并可能成为判断骨肉瘤预后的两个新的参考指标。

3.3　其它

CEA是一种细胞表面糖蛋白,属细胞粘附分子免疫球蛋白超家族。不少肿瘤能产生 CEA,并可能与肿瘤转移相关[10]。本实验结果显示 OS-732细胞表达一定量的 CEA,CEA与骨肉瘤转移的关系尚不清楚,有待进一步研究。本实验证实 CEA可能是骨肉瘤的一种新的肿瘤标记。

BMP是一种骨源性生长因子(BDGF),人和鼠骨肉瘤中含有丰富的 BMP。骨肉瘤 BMP表达阳性率可高达 85%,而产生 BMP的骨肉瘤,术前化疗效果不佳,83%伴有肺转移[11]。本实验结果表明:OS-732细胞表达 BMP,所以推测本细胞系具有一定的转移潜能。

增殖细胞核抗原(PCNA)是一种仅在增殖细胞中合成和表达的 36-kDa多肽,在正常组织和肿瘤组织中均存在,但肿瘤组织中含量高。有关 PCNA免疫细胞化学在肿瘤诊断和研究中的应用报道很多,并认为 PCNA对分级和判断预后有价值。本细胞系 PCNA呈强阳性,证明其分化低、恶性程度高,并推测其浸润转移能力强。

综上所述本实验采用 10种抗体检测了 OS-732细胞系,所选多为近年来用于判断肿瘤恶性程度、浸润行为和转移潜能,进而推测肿瘤患者预后有价值的指标。特别是抑癌基因产物、基质降解酶类和增殖细胞核抗原等已作为新的独立性预后指标广泛用于临床。本实验结果表明 OS-732细胞多项与转移相关的免疫表型阳性表达,不仅证实 OS-732细胞具有一定的转移潜能,而且为进一步探讨骨肉瘤的高转移机理提供了一定的实验基础。

参考文献

1 Witzel J G, Prescher A, Weisser H. Experimental animal model for the evaluation of chemotherapeutical effects on osteosarcoma. Chemotherapy, 1992, 38: 251

2 张佩玉,王红霞,蒋海燕等.人成骨肉瘤细胞系 OS-732的建立及其特征的观察.中华骨科杂志,1985, 5(2): 100

3 Toguchida J, Yamaguchi T, Ritchie B *et al*. Mutation spectrum of the p53 gene in bone and soft tissue sarcomas. Cancer Res, 1992, 52(22): 6194

4 王　东,陈　俐,高奉浔.骨肉瘤 p53蛋白与增植细胞核抗原免疫组化研究.诊断病理学杂志,1996, 3(3): 156

5 Ogden G R, Kiddie P A, Lunny D P *et al*. Assesment of p53 protein expression in normal, benign, and malignant oral mucosa. J Pathol, 1992, 166(4): 389

6 Sturzbecher H W, Chumakov P, Welch W J *et al*. Mutant

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

p53 proteins bind hsp 72/73 cellular heat shock related proteins in SV-40-trasformed monkey cells. Oncogene, 1987, 1: 201

7 Porter P L, Gown A M, Kramp S G *et al*. Wide spread p53 over expression in human malignant tumors. Am J Pathol, 1992, 140(1): 145

8 Marx J. New tumor suppressor gene may rival p53. Science, 1994, 264: 344

9 Steeg P S, Cohn K H, Leone A. Tumor metastasis and nm23. Current concepts. Cancer cell, 1991, 3(7): 257

10 Hostetter R B, Campbell D E, Chi K *et al*. Carcinoembryonic antigen enhances metastastic potential of human colorectal carcinoma. Arch Surg, 1990, 125: 300

11 周延冲 主编.多肽生长因子—— 基础和临床.北京: 中国科学技术出版社, 1992. 69

(收稿: 1997-01-10;修回: 1997-06-25)

(编辑 冷怀明)

A study on the invasion- and metastasis-related immunophenotype of human osteosarcoma cells

Liu Guang, Gao Fengxun, Wang Dong, Feng Suzheng (Department of Clinical Pathology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

Abstract Objective: To investigate the characteristics of the invasion- and metastasis-related immunophenotype of human osteosarcoma cells and possible mechanism of its metastasis and provide the possible indices for evaluating the prognosis of patients with osteosarcoma in clinical practice. Methods: The expression of 10 metastasis-related antigens in a human osteosarcoma cell line OS-732 was determined with immunocytochemistry. Results: In the cell line, only the antigen p53-Pab1801 was negatively stained. Conclusion: The cell line is of high infiltrative capacity and metastatic potential. This provides some experimental evidences for further exploration of the reason for the high metastatic rate of osteosarcoma.

Key words osteosarcoma; cell line; infiltration; metastasis; immunophenotype; immunocytochemistry

双侧上下泪道阻塞手术治疗比较

Comparison between two kinds of surgical managements in a patient with bilateral block of the superior and inferior lacrimal passages

王 一 许立军 (第三军医大学附属西南医院眼科) 重庆, 400038

泪道阻塞是眼科临床常见病,但上下泪道同时阻塞,尤其双侧上下泪道多处阻塞则少见,治疗比较困难,预后较差,我们收治了一例,报道如下:

刘×× ,男, 29岁,因右眼流泪、溢脓半年,左眼流泪、溢脓四月入院。入院前一月曾在县医院反复冲洗泪道。入院查: 视力正常,挤压泪囊区: 右侧自上泪小点溢出大量脓液,左侧无脓液溢出。冲洗泪道右下泪小管不通,左上下泪小管不通,入院后分别予"左眼泪小管挂线+ 鼻泪管插管术"和"右眼泪小管挂线+鼻腔泪囊吻合术",术中见左泪总管也有阻塞,双泪囊内均有大量脓液,术后三个月拔除挂线及插管,冲洗泪道通畅,随访10个月,右侧通畅,左侧部分通畅。

泪道阻塞依阻塞部位和疗法不同而疗效不一,本例双侧上下泪道多处阻塞实属少见,我们采用两种术式比较,虽均达到治疗目的,但随访结果表明,右侧更佳。这一结果的差异我们认为有两方面的原因: (1)左侧阻塞位点较右侧多, (2)对鼻泪管的阻塞处理方法不同。因此我们认为:① 挂线治疗泪小管阻塞是一种有效的方法;② 鼻泪管阻塞采用泪囊鼻腔吻合术较单纯插管效果更好;③ 根据病史本例患者的泪小管阻塞可能与反复冲洗泪道有关,因此应当指出: 冲洗泪道一是手法要正确,二是不要做不必要的反复冲洗,避免医源性损害。

关键词 泪管阻塞 外科手术

中图法分类号 R777.22

参考文献

1 吴振中,蒋幼匠.主编.眼科手术学.北京: 人民卫生出版社, 1994. 525~530

(收稿: 1996-11-25;修回: 1997-03-09)

(编辑 张大春)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net