

## Ⅱ型碳酸酐酶在骨巨细胞瘤中的表达

赵宁侠 于世凤 庞淑珍 高岩

**摘要** 本文通过免疫组织化学方法,对石蜡切片的骨巨细胞瘤及体外培养的肿瘤性多核巨细胞进行碳酸酐酶Ⅱ染色,结果发现在石蜡切片中的95%以上多核巨细胞与破骨细胞一样呈强阳性表达,部分(50%左右)圆形单核基质细胞呈阳性或弱阳性表达,梭形单核基质细胞呈阴性。玻片培养的多核巨细胞也是阳性但着色较浅。本研究表明多核巨细胞与破骨细胞性骨吸收有共同之处,都是通过碳酸酐酶产酸后经质子泵分泌到局部微环境中进行脱矿。本研究进一步证实了肿瘤性多核巨细胞可能与破骨细胞一样来源于同一前体细胞。

**关键词** 多核巨细胞 碳酸酐酶Ⅱ 破骨细胞 骨巨细胞瘤

### Expressions of carbonic anhydrase Ⅱ in giant cell tumour of bone

Zhao Ningxia, Yu Shifeng, Pang Shuzhen and Gao Yan

(Department of Pathology, School of Stomatology, Beijing Medical University, Beijing 100081, China)

**Abstract** In this study we stained the paraffin sections of giant cell tumour (GCT) of bone and the coverslips of multinucleated giant cells (MGC) in vitro by immunohistochemical method, with anti-carbonic anhydrase Ⅱ (CA Ⅱ) antibodies. In paraffin sections, over 95% of MGC expressed the CA Ⅱ, a few of round-shaped stromal cells (about 50%) expressed CA Ⅱ weakly and the spear-shaped stromal cells did not express CA Ⅱ. In coverslips in vitro, MGC also expressed CA Ⅱ but the colour was light. It indicated that the MGC bone resorption, just like that of osteoclasts, required the action of proton pumps to transport acid, which generated from CA Ⅱ, into the local microenvironment to dissolve the mineral. It further demonstrated that MGC and the osteoclasts might be derived from the same precursor cells.

**Key words** Multinucleated giant cells Carbonic anhydrase Ⅱ Osteoclasts Giant cell tumour of bone

破骨细胞在局部微环境中分泌酸和蛋白酶进行骨吸收,其分泌的酸是通过碳酸酐酶(Carbonic Anhydrase, CA)将 $\text{CO}_2$ 溶于水形成 $\text{H}_2\text{CO}_3$ 而产生的,可见CA在破骨细胞骨吸收中具有重要作用。最近本实验室观察到骨巨细胞瘤(Giant Cell Tumour of Bone, GCT)的多核巨细胞(Multinucleated Giant Cell, MGC)具有与破骨细胞相似的体外吸收骨的作用。为进一步了解MGC与破骨细胞相似特征,本研究采用免疫组织化学方法,观察MGC的CAⅡ染色反应。

### 1 材料与方法

**1.1 资料来源:**石蜡组织块来自我室47年~96年间的骨巨细胞瘤标本。细胞培养标本3例,分别由北京医科大学第二、第三附属医院及积水潭医院骨科提供。

**1.2 MGC的分离培养:**无菌条件下取瘤组织于199培养液内(含15%小牛血清,100u/ml青、链霉素,25mM的HEPES)剪碎,吸管反复吹打悬液后,将悬液种于含6mm×6mm玻片的24孔培养板内,孵育4小时(37℃,5% $\text{CO}_2$ )后,洗去表面未贴壁细胞,再培养24小时后,PBS洗10分钟2次。丙酮固定10分钟,-70℃冰箱保存。

**1.3 免疫组织化学SP法染色:**石蜡切片二甲

苯脱蜡,种有细胞的玻片入0.5% Triton X-100 20分钟。分别入0.3%  $H_2O_2$  20分钟,正常血清封闭10分钟。PBS洗5分钟3次后加1抗1:60(免抗鼠 CA I 抗体,由芬兰 OULU 大学 H. K. Vaananen 教授赠送)室温下45分钟。PBS洗5分钟3次,加2抗1:400(生物素标记的鼠抗免 IgG, 1% BSA-PBS 稀释)30分钟。PBS洗5分钟3次,加3抗1:400(辣根酶标记的链酶卵白素,2,3抗皆由 Sant Cruz 公司生产)30分钟。PBS洗5分钟3次,DAB 显色5分钟。15秒苏木素复染、脱水、透明、封片。阴性对照组分为两组,方法对照由 PBS 替代1抗,阴性组织对照为 GCT 中梭形间质细胞。阳性对照组为体外培养的 SD 大鼠正常破骨细胞。

## 2 结果

### 2.1 石蜡切片:

(1) HE 染色:瘤组织由两种细胞组成:MGC 和单核基质细胞,其中单核基质细胞可见两种形态,一种较多,呈梭形,另一种较少,呈圆形。MGC 散在于基质细胞之间,有时分布均匀,有时呈簇状分布。MGC 大小及核数不等,大的核数可达上百个,核仁明显,胞浆嗜酸性。组织中可见微血管分布。

(2) 免疫组化染色:MGC(95%)无论大小皆呈强阳性表达,胞浆呈棕色,部分圆形单核细胞(50%左右)也呈阳性或弱阳性表达。梭形单核基质细胞为阴性。

### 2.2 体外培养 MGC 玻片:

(1) HE 染色:MGC 较大,核较多(几十至几百),形态不一,有的似圆形或椭圆型,核居中,有的似半月形,核居于一侧,还有些呈不规则状,有许多伪足。胞浆嗜酸性,有的可见许多泡沫样空泡。

(2) 免疫组化染色:MGC 呈阳性,胞浆内有棕色颗粒,但较石蜡切片中的 MGC 染色浅。

## 3 讨论

CA 在哺乳类至少有三种同工酶,其中两种在红细胞和其它一些组织中出现,第三种几乎只在纹状肌中表达。自1960年 Dulce<sup>[1]</sup>等发现使用该酶的阻断剂可抑制甲状旁腺激素引起的

骨吸收,人们才开始将 CA 与骨吸收相联系。

骨吸收主要包括酸脱矿及蛋白酶降解骨胶原。破骨细胞褶皱缘上有由空泡型  $H^+$ -ATPase 启动的质子泵分泌酸的功能,不仅使局部微小环境酸度增加,对溶酶体酶的分泌也有协同作用,可见产酸在整个骨吸收过程中的重要作用,而酸是由 CA 对  $CO_2$  和  $H_2O$  的作用而产生的,所以,CA 是破骨细胞在骨吸收中的关键部分之一。Gay<sup>[2]</sup>(1979年)通过标记 CA I 阻断剂 acetazolamide 观察到破骨细胞中有 CA I 与之结合。Vaananen<sup>[3]</sup>(1983年)使用免疫组织化学方法也观察到鼠破骨细胞中有 CA II 的表达。Sly<sup>[4]</sup>(1985年)发现骨硬化病的家族成员中 CA II 缺乏。这些都说明了 CA I 在破骨细胞性骨吸收及骨代谢中的重要作用。

最近有许多文献报道 GCT 中多核巨细胞具有破骨细胞的形态及功能特点<sup>[5,6]</sup>,本实验室也发现 MGC 具有体外骨吸收功能<sup>[7]</sup>。为比较 MGC 与破骨细胞性骨吸收的异同,本研究对 MGC 做 CA II 分析。本文采用免抗鼠 CA I 抗体对人 GCT 进行染色是由于鼠与人有交叉抗原 Vaananen<sup>[8]</sup>。

本研究发现 MGC 中 CA II 为阳性表达,与破骨细胞相同。其中少部分圆形单核细胞也呈阳性表达,这提示该细胞与 MGC 之间有相近似的特点,为证实 MGC 源于这些圆形单核细胞的融合的假说提供了依据。

本研究还发现贴壁于玻片的细胞染色较浅,这可能有两种原因,其一可能是由于培养的细胞密度低,不易着色,这在 HE 染片中也有同样的现象。其二可能是由于贴壁的 MGC 处于非功能状态,无骨吸收作用,故 CA I 酶活性降低,这一点有待于今后与贴于骨片上的 MGC 进行比较。若是后一种原因,则更说明 CA I 在 MGC 骨吸收中的作用。

总之,本研究结果表明 MGC 与破骨细胞一样都有 CA II 的高表达。这提示 MGC 的骨吸收具有破骨细胞性骨吸收特点,都是由 CA I 产生酸,再经质子泵分泌到微小环境中进行脱矿,进一步证实 MGC 可能与破 (下转第23页)

啉测量,结果显示40岁以上的女性及全部男性患者较正常组明显升高,说明在此过程中骨吸收增加。尿脱氧吡啶啉的检测,为我们提供了一个更为直观地了解甲减骨吸收情况的方法。

甲状腺激素对新骨形成及骨质溶化均有促进作用<sup>[1]</sup>。甲减时由于血液中的甲状腺激素水平降低,骨组织重建本应受到抑制<sup>[2]</sup>,即骨吸收、骨钙更新减慢,骨小梁破骨细胞吸收活性降低,皮质骨破骨细胞吸收也降低,X线检查时骨密度可能增加<sup>[2]</sup>。但是因为甲状腺激素是腺垂体、甲状旁腺、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 发挥作用的重要条件,且在女性甲减时促进同化的孕激素等也分泌不足<sup>[2]</sup>,故而本试验中甲减组较正常对照组骨密度显著减低,其原因可能是由于甲状腺激素水平降低,同时合并多因素的影响,导致骨生成不足,骨吸收加快,最终出现相对性的骨量减少。此结论由表2~3结果得到,其详细机制,我们将在日后的临床工作进一步研究。

甲减患者的骨密度测定结果,部分患者已有骨量减低但尚不能达到骨质疏松的诊断标准,在临床易被忽视,故而对甲减患者定期进行骨密度测量的同时,其相关生化指标如DPD测

定,更应被重视。尿DPD检测价格低,检测方便,反应骨吸收之特异性强,可早期诊断和预防骨质疏松症的发生,并对提高生活质量起到积极作用。

临床甲减患者例数相对较少,致试验样本数较少,可能导致试验结果与骨代谢的真实水平发生偏差。本研究的一些结论有待进一步检验证实。

## 参 考 文 献

- 1 池芝盛. 内分泌学基础与临床, 第一版, 北京: 科学技术出版社, 1992, 140~175.
- 2 程志平. 内分泌生理学, 第一版, 北京: 人民卫生出版社, 1984, 221~224.
- 3 金世鑫. 骨质疏松综合征的诊治基础及临床联系, 第四届全国骨质疏松学术研讨会交流材料, 1996.
- 4 Seibel MJ, Wotjge. Urinary hydroxypyridinium crosslinks of collagen in population-based screening for overt vertebral osteoporosis: result of a pilot study. J Bone Miner Res, 1994 Sep, 9(9): 1433-1440.
- 5 Egger LD, Muhlbauer RC. Evaluation of urinary pyridinium crosslink excretion as a marker of bone resorption in the rat J bone Miner Res, 1994 Aug, 9(8) 1211-1219.