

分离培养骨巨细胞瘤破骨样细胞的方法学研究

赵宁侠 于世凤

摘要 本文通过组织块贴壁法、机械分离法和酶消化法对骨巨细胞瘤的破骨样细胞进行分离、培养。通过比较,结果显示:酶消化法提纯程度最高,收获量较多;机械分离法居中,但操作简单,对原位杂交、免疫组织化学和骨吸收功能检测具有一定的应用价值;组织块培养法需要时间长,各细胞成分混杂,对研究各细胞成分之间的关系,有一定帮助。

关键词 骨巨细胞瘤 破骨样细胞 体外培养

Methods of isolation and culturing osteoclast-like cells of giant cell tumour

Zhao Ningxia, Yu Shifeng

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

Abstract We cultured the osteoclast-like cells (OLC) from giant cell tumour of bone *in vitro* by three methods. Comparison of the methods shows that isolation of the OLC by trypsin can obtain the purest and greatest amount of OLC. Mechanical isolation is simple and useful for *in situ* hybridization, immunohistochemistry and detection of bone resorption. Explant culture requires long time and contains various cells from giant cell tumour, which is helpful in studying the relationship between these cells.

Key words Giant cell tumour Osteoclast-like cells *In vitro* culture

30年代初,国外已有少量报道体外培养骨巨细胞瘤(giant cell tumor of bone, GCT)的研究。我国自1980年^[1,2]也开始了体外培养 GCT 的研究。这些方法大都将 GCT 中各细胞成分混合培养,或经反复传代后,只培养纤维型单核基质细胞(fibroblast-like stromal cell, FSTC),不能对破骨样细胞(osteoclast-like cell, OLC)作仔细观察研究。本文比较了几种体外分离、培养 OLC 的方法,为研究 OLC 建立实验方法提供参考。

1 材料和方法

1.1 标本来源

GCT 培养标本共17例,主要由积水潭医院

骨肿瘤科提供,在培养前均做冰冻切片对手术新鲜 GCT 标本进行诊断核实。

1.2 体外分离、培养

取肿瘤灰红柔软的部位,在含青霉素(1000 U/ml)链霉素(100 U/ml)的 Hanks 液中,浸洗3遍。

1.2.1 组织块贴壁法

将取材的瘤组织,切成1 mm³大小的碎块。用吸管吸取小组织块,均匀铺贴于培养皿内。注入含15% FCS 的 α -MEM 培养液,置37℃温箱2小时,待组织块与平皿底粘附后,再补加培养液,于5% CO₂培养箱内37℃培养。3天后换液1/2。部分培养皿内加入1 cm²的无菌盖玻片,使组织块贴附其上,以便观察研究。

1.2.2 机械分离法

将瘤组织切碎,加入少量培养液,将其悬浮,用吸管反复吹打,使其间细胞游离于培养液

本课题受国家自然科学基金资助

作者单位:100083 北京医科大学口腔医学院病理室

内,静置30秒,将上层悬液吸出置培养瓶(含玻片)内培养。分别于30分钟、1、2、4、6、8、10、14、18和24小时取出玻片,滴洗未贴壁的血细胞,每个时间点取5张玻片,在镜下观察,记数各类细胞,取平均值(取1例做时间图)。

1.2.3 酶消化分离法

于剪碎的瘤组织中加入含0.25%胰酶-EDTA和2 mg/ml 胶原酶的 α -MEM(含15% FCS),混合30分钟,800g离心2分钟,取上层悬液,洗涤、种于培养瓶内。48小时后换液,并用PBS充分洗涤后,加入胰酶-EDTA消化液3分钟,吸出消化液,洗涤后再培养。原培养瓶内加入培养液,继续培养观察。

1.3 OLC形态学观察

1.3.1 常规组织切片观察。

1.3.2 体外培养倒置相差显微镜观察。

1.3.3 体外培养细胞HE、姬姆萨和瑞氏染色、观察。

2 结果

2.1 组织结构观察

不同的GCT,其各细胞成分的比例不相同。但主要由两种形态的细胞组成:即多核巨细胞又称OLC和单核STC。OLC较大,含多个核,其数目在不同肿瘤组织中不同,一般在10~30左右,多者可达上百个。单核STC从形态上又可分为两种,一种呈梭形,似纤维母细胞,占单核细胞绝大多数,其生长分化程度与肿瘤的性质相关。另一类呈圆形,胞浆稍宽,似单核巨噬细胞,该细胞较少。此外,GCT间质含量也各不相同,主要是一些纤维成分,其间散在一些毛细血管。大部分圆形单核细胞以及OLC分布于靠近毛细血管处。

2.2 倒置相差显微镜观察

2.2.1 组织块贴壁法

16小时后,组织块周围有梭形或圆形的单核细胞游出。OLC游走较慢,3日后组织块周围形成一圈生长晕,主要可见3种形态的细胞:梭形单核细胞(FSTC)、圆形单核细胞即巨噬细胞

型单核基质细胞(macrophage-like stromal cell, MSTC)和体积较大的OLC。其中FSTC生长迅速,占细胞成分绝大多数,OLC由FSTC围绕。在部分区域可见到MSTC密集成片。经传代后(<5代)OLC和MSTC逐渐消失,FSTC仍继续存活。

2.2.2 机械分离法

于不同时间点取出玻片观察:OLC和MSTC贴壁较早(30分钟出现),随着时间延长,其贴壁数逐渐增加,大约10小时左右其贴壁数开始减少,而FSTC逐渐增多。24小时后细胞基本不再贴壁,FSTC开始增殖分裂,并逐渐长满平皿。OLC数量未见增加,见图1。

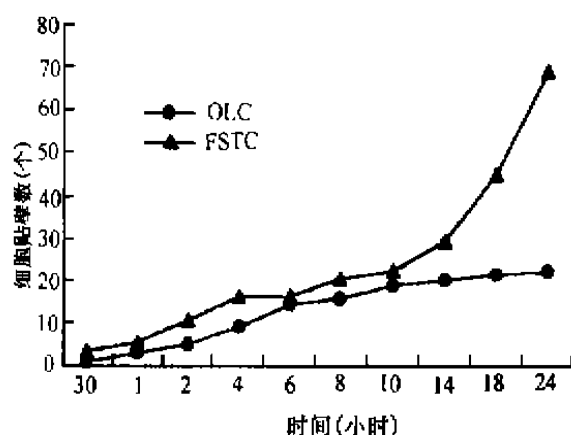


图1 不同时间点GCT中细胞贴壁数变化

2.2.3 酶消化分离法

细胞悬液生长48小时后,可见各类细胞均已贴壁伸展。经酶消化后,大部分FSTC脱落(95%以上),而OLC和部分MSTC仍贴于平皿。将消化液内FSTC继续培养,可形成传代的FSTC系,OLC继续培养未见增殖。随时间延长,OLC有些结构模糊,胞浆内出现颗粒样物,逐渐死亡,似程序性死亡即凋亡,也有些脱落,浮于培养液内死亡。最长可存活20天左右。

2.2.4 OLC的HE、瑞氏和姬姆萨染色观察

OLC形态与OC极为相似体积大,核较多,一般在10~30个,有时可多达上百个。OLC胞浆内常有空泡样结构,有时呈泡沫样,胞浆周边有突起,并有活跃的伪足样运动,使OLC形态

各异,如圆形、月牙形、扇形和其他不规则形态。

3 讨论

本文通过体外培养 GCT,观察到只有 FSTC 可反复传代,而 OLC 及 MSTC 无增殖能力。该结果支持了以往的观点,即 FSTC 是 GCT 中的肿瘤成分,而 OLC 与 MSTC 是非肿瘤性细胞^[3,5]。组织学观察到 OLC 和 MSTC 大多围绕血管周围,也提示 MSTC 和 OLC 可能是由于肿瘤组织中分泌的某种趋化剂,使两者经循环系统进入瘤组织,说明 MSTC 和 OLC 是反应性细胞,是非肿瘤成分。

国内、外许多资料表明 GCT 中主要分三类细胞,一类是肿瘤的实质成分即 FSTC,另外两类与肿瘤免疫机制相关,即 OLC 及 MSTC。关于 OLC 及 MSTC 的来源及性质文献中尚有争议。多数报道认为^[6,8],MSTC 在形态和超微结构上与 OLC 部分相似,经传代培养皆不能长期存活,两者都具有巨噬细胞的特点,如耐胰蛋白酶作用、NSE 阳性和能与抗巨噬细胞的单克隆抗体结合等,说明 OLC 与 MSTC 可能来源于同一种细胞系,并且 MSTC 可能是 OLC 的前体细胞。本研究观察到的 OLC 与 MSTC 的胞浆宽,都无增殖能力,耐胰酶以及围绕血管周围分布等相似特点与文献报道的一致。

GCT 中含有大量的 OLC,一些研究表明 OLC 具有破骨细胞的特点,如具有降钙素受体,抗酒石酸酸性磷酸酶阳性,体外骨吸收功能以及具有皱褶缘结构等。本研究观察到其形态

与破骨细胞的许多相似之处,如多核、多空泡、多伪足、多形态等。因而,对研究 GCT 病理特点和破骨细胞生物学将有明显的意义。

本文通过比较三种分离培养 OLC 的方法表明:①酶消化法提纯程度较高,收集量较多。②机械分离法纯化程度居中,时间长短不便掌握。由于操作简单,对一些要求纯化程度不高的研究如原位杂交、免疫组化和骨吸收功能检测等,也同样具有一定的应用价值。③组织块培养法需要时间长,各细胞成分混杂,对研究各细胞成分之间的关系,以及三者分化发育过程,有一定帮助。

参 考 文 献

- 1 冯传汉,蔡玉辉,张嘉庆,等.骨巨细胞瘤体外培养观察.北京医学院学报,1980,12,(1),1-5.
- 2 张嘉庆,蒋化龙,冯传汉,等.骨巨细胞瘤体外培养观察.北京医学院学报,1980,12,(1)7-9.
- 3 Ishii S, et al. Intern Orthop, 1978, 2, 77.
- 4 Bayer VS, et al. Quantitative immunofluorescence studies of the tumour antigen-bearing cell in giant cell tumour of bone and osteogenic sarcoma. Cancer Res, 1975, 35, 2520.
- 5 冯传汉,张嘉庆,蔡玉辉.骨巨细胞瘤长期体外培养观察.北京医学院报,1980,12(2),79-81.
- 6 Lu Ping. Cytological observation on giant cell tumour of bone. Chin Med J, 1984, 97, 411.
- 7 卢平,张嘉庆,冯传汉,等.骨巨细胞瘤的巨噬细胞.中华外科杂志,1985,23(5),269-272.
- 8 郭卫,冯传汉,许万鹏.骨巨细胞瘤的多核巨细胞.中华骨科杂志,1994,11,679-681.
- 19 Tekeuchi Y, Nakayama K, Matsumoto T. Differentiation and cell surface expression of transforming growth factor- β receptors are regulated by interaction with matrix collagen in murine osteoblastic cells. J Biol Chem, 1996, 271, 3938.
- 20 Moursi AM, Damsky CH, Cull J, et al. Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation. J Cell Sci, 1996, 109, 1369.
- 21 Ganta DR, McCarthy M, Gronowicz GA. Ascorbic acid alters collagen integrins in bone culture. Endocrinology, 1997, 138, 3606.
- 22 Doherty WJ, Derome ME, McCarthy MB, et al. The effect of glucocorticoids on osteoblast function. J Bone Joint Surg Am, 1995, 77, 396.

(上接第82页)