

人骨肉瘤细胞系 OS-732 诱导微血管生成的解剖显微结构及超微结构观察

李颖嘉¹, 王东², 周娅³ (第一军医大学南方医院¹ 超声科,³ 呼吸科, 广东 广州 510515; ² 第三军医大学大坪医院病理科, 重庆 400042)

摘要:目的 观察人骨肉瘤细胞系 OS-732 诱导微血管生成的解剖显微结构及超微结构特点。方法 应用鸡胚绒毛尿囊膜模型, 通过解剖显微镜、光镜及透射电镜观察该细胞系诱导生成微血管的解剖显微结构及超微结构特点。结果 OS-732 细胞系具有较强的诱导血管生成能力, 解剖显微镜下可见血管辐辏现象, 透射电镜下可见新生血管壁由单层内皮细胞构成, 内皮细胞裂隙增宽, 基底膜不完整, 缺乏平滑肌成分。结论 肿瘤诱导的新生血管在病理、生理及形态功能方面都具有特征性, 以血管为靶点治疗骨肉瘤对改善预后可能具有重要意义。

关键词: 骨肉瘤 / 病理学, 新生血管化, 病理性, 绒毛膜, 尿囊

中图分类号: R349.21; R738.102 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2002)02-0127-03

Observation of the microstructure and ultrastructure of microvessels induced by OS-732 cell line

LI Ying-jia¹, WANG Dong², ZHOU Ya³

Departments of Ultrasonography¹ and Respiratory Diseases³, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Department of Pathology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

Abstract: Objective To observe the characteristics of the microstructure and ultrastructure of the microvessels induced by human osteosarcoma cell line (OS-732). **Methods** OS-732 cells were inoculated into the chick embryo chorioallantoic membrane to induce the growth of microvessels, the microstructure and ultrastructure of which were observed using dissecting microscope, light microscope and transmission electron microscope. **Results** OS-732 cell line was strongly angiogenic, and newly generated capillaries converging upon the tumor were visualized under dissecting microscope. Observation with transmission electron microscope found that the wall of the microvessels deficient in elements of smooth muscles was consisted of a monolayer of vascular endothelial cells with widened gaps in between, and the basement membrane appeared irregular. **Conclusion** The microvessels induced by tumors have pathological and physiopathological characteristics consistent with the tumors, and setting the microvessels as a therapeutic target against osteosarcoma may help improve the prognosis of patients with this disease.

Key words: osteosarcoma/pathology; neovascularization, pathologic; chorion; allantois

肿瘤是典型的血管依赖性病变, 新生血管不仅为肿瘤细胞旺盛的生化代谢建立了运输通道, 也为肿瘤的浸润转移提供了便利条件^[1]。近年来关于肿瘤血管生成以及血管生成对肿瘤生物学行为影响的研究有了较大进展, 这对判断肿瘤的进展、转移、预后以及临床抗肿瘤血管生成治疗具有重要意义^[2]。我们以往的研究提示骨肉瘤微血管密度与患者生存时间负相关^[3]。在此基础上, 我们以鸡胚绒毛尿囊膜为模型, 通过解剖显微镜、光镜及电镜观察人骨肉瘤细胞系 OS-732 诱导微血管生成的特点, 为深入了解骨肉瘤血管生成的特征性及抗血管生成治疗提供实验依据。

1 材料和方法

收稿日期 2001-08-16

基金项目: 全军九五青年基金(96Q074)

作者简介: 李颖嘉(1968-), 女, 重庆人, 1999年毕业于第三军医大学, 硕士, 主治医师, 电话 020-85142100

1.1 细胞株和细胞培养

人骨肉瘤细胞株 OS-732 购自北京积水潭医院骨科实验室, 体外培养 100 代以上, 病理组织学分型为骨母细胞型。OS-732 细胞常规培养于含 10% (质量分数) 新生小牛血清 RPMI-1640 培养基中, 37℃、5% CO₂、95% 空气、饱和湿度下 CO₂ 孵箱内培养。

1.2 胚蛋孵化及制备

胚蛋源于西南农业大学养鸡场, 选择大小相仿的纯种华联鸡蛋, 经福尔马林熏蒸消毒 20 min 后置于 37.8℃、相对湿度 60%~80% 的恒温孵箱中孵育, 胚头斜向上方。孵育至第 9 天时制备鸡胚绒毛尿囊膜 (chick embryo chorioallantoic membrane, CAM), 制备方法参照文献 4 并加以改进 (1) 在胚蛋气室端钻约 1.0~2.0 mm 的小孔穿透气室壳膜, 并以吸耳球在小孔处行负压吸引造成假性气室, 使尿囊膜下陷与卵壳膜分离 (2) 照卵灯下寻找胚头, 在距胚头前 1 cm、两条前卵黄静脉之间卵壳投影部位选定约 0.5 cm×1.5 cm 的

长方形开窗位置 (3) 75%酒精消毒卵壳,用牙科细砂轮沿长方形区的边线磨切卵壳,勿伤及下方卵壳膜,用眼科镊夹住卵壳缘揭除卵壳,暴露卵壳膜,倾去卵壳粉尘 (4)用注射针头在卵壳膜上轻轻划破直径 1 mm 小孔(勿伤及下面的 CAM),以吸耳球在小孔处行负压吸引,待 CAM 下陷后剪除长方框内卵壳膜,暴露 CAM。

1.3 瘤细胞接种及实验分组

胚蛋 20 只,随机分为 2 组(实验组和空白对照组),每组 10 只。实验组暴露已制备好的 CAM,选择近胚头 1 cm 处、两条前卵黄静脉间的相对无血管区接种对数生长期 OS-732 细胞,每只 $5 \times 10^6/100 \mu\text{l}$ 。空白对照组开窗后不给予任何措施,用以排除胚蛋开窗后污染、操作技术等非处理因素对实验结果的干扰,于接种第 2 天至接种第 9 天在解剖显微镜下逐日观察接种区 5 mm 范围内血管数目及形态学变化。

1.4 电镜观察

CAM 移植瘤标本以 3%戊二醛磷酸缓冲液固定,经 0.2 mol/l 蔗糖磷酸缓冲液漂洗,用 1%锇酸后固定,梯度丙酮脱水,环氧树脂 618 包埋,定位,超薄切片,醋酸铀-柠檬酸铅双重电子染色,在 JEM 2000EX 型透射电镜下观察。

1.5 组织切片的制备和观察

CAM 常规 4%多聚甲醛原位固定 15 min,以接种区为中心取膜,标本石蜡包埋,4 μm 连续切片,行 HE 染色。

2 结果

2.1 OS-732 细胞诱导血管生成过程

CAM 接种瘤细胞后第 2 天肿瘤细胞开始生长,接种区周围血管增生,并向接种区爬行,部分宿主大血管向接种区弯曲并相应扩张。当新生血管接触接种区时,血管呈放射状集中,即“血管辐辏现象”(图 1)。第 3~6 天,血管及瘤细胞生长旺盛,血管长入或跨越接种区,出现血管化现象,瘤细胞间出现大量带有核红细胞的鸡血管。第 7~8 天,血管及瘤细胞生长速度减慢。第 8~9 天,可出现中心性出血坏死。空白对照组 CAM 血管呈正常树枝状走行,无“血管辐辏现象”,血管密度明显低于瘤细胞接种组(图 2)。

2.2 OS-732 细胞诱导的新生血管超微结构

瘤细胞核形状不规则,核膜凹陷,异染色质分布不均,核浆比例增大,细胞内细胞器较少。瘤细胞之间新生血管密集,血管壁由单层内皮细胞构成,内皮细胞裂隙增宽,基底膜不完整,血管壁缺乏平滑肌成分(图 3)。

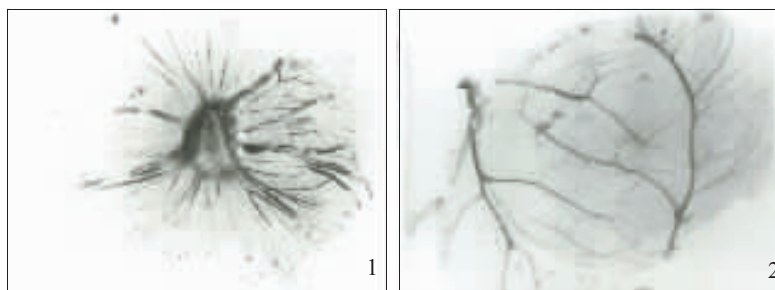


图 1 鸡胚孵化 18 d 时瘤细胞接种组 CAM 肿瘤诱导血管生成

Fig.1 Angiogenesis induced by tumor cell line on 18-day-old chick embryo chorioallantoic membrane

图 2 鸡胚孵化 18 d 时空白对照组 CAM 毛细管

Fig.2 Normal capillaries on 18-day-old chick embryo chorioallantoic membrane

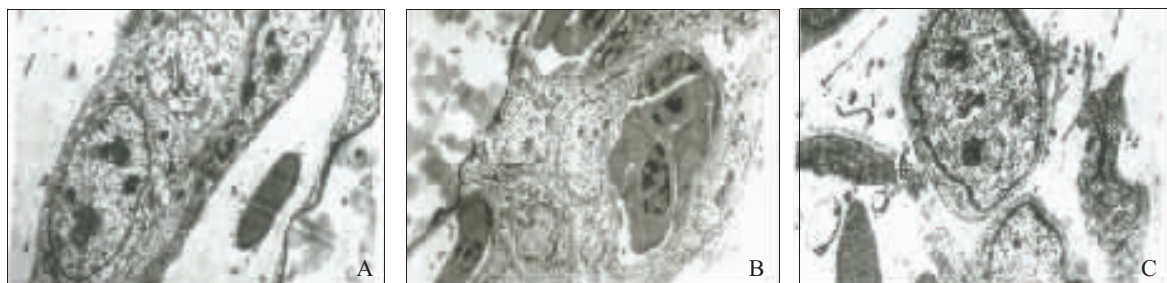


图 3 OS-732 细胞诱导的新生血管超微结构

Fig.3 Ultrastructure of newly generated capillaries induced by OS-732 cell line

A: The microvessel wall is short of smooth muscle with irregular basement membrane (TEM, $\times 8\ 000$); B: The newly generated capillaries are concentrated among the tumor cells with depressed nuclear membrane, increased karyoplasm ratio, scattered heterochromatin and few organelles (TEM, $\times 3\ 000$);

C: The wall of the microvessels is consisted of a monolayer of vascular endothelial cells with widened gaps where the tumor cells are also observed (TEM, $\times 10\ 000$)

3 讨论

实验证实实体瘤只有具备了血管生成表型后才能恶性生长和成功转移。当肿瘤半径 < 2 mm 时,它主要依靠弥散在细胞周围的营养物质和氧气生存。随着原位肿瘤细胞的不断增殖,肿瘤本身或宿主组织将建立起新生血管网。新生血管网的生成取决于肿瘤周围微环境中正负调控因子的平衡,转移的肿瘤细胞将建立起自己的血管网络,从而打破宿主内在微环境的平衡。早在 20 世纪 70 年代, Hori^[5]就观察到肿瘤细胞诱导新生血管形成,“吸引”宿主血管主干向致瘤区弯曲、靠近,呈放射状集中现象。应用 CAM 模型,我们动态地观察到骨肉瘤 OS-732 细胞具有较强的促血管生成能力,其诱导血管生成过程与 John 的观察一致。肿瘤诱生的血管,无论在病理、生理还是形态功能上都有着特征性^[6]。应用透射电镜我们观察到骨肉瘤 OS-732 细胞诱生的新生血管基底膜不完整,内皮细胞裂隙增宽,缺乏平滑肌等特点。这些特点一方面使肿瘤血管通透性增高,有利于血浆蛋白和纤维蛋白外渗至细胞外间隙,外渗的纤维蛋白与其他蛋白质如纤维连接蛋白等凝结成纤维凝胶,为成纤维细胞、内皮细胞和其他细胞迁移提供暂时的基质成分,并最终转化为血管化的连接组织^[7];另一方面血管通透性增高及基质形成有利于肿瘤细胞脱落进入血管或向邻近基质扩散,后一过程主要受黏附作用、细胞迁移力及一些基质水解酶的影响。越来越多的证据表明新生血管形成与肿瘤生长和转移密切相关^[8,9],因此研究肿瘤血管生成过程与正常血管生成过程的差异,寻找肿瘤血管特征性靶点,将为抗肿瘤治疗开辟新的途径。

肿瘤的持续生长和侵袭转移有赖于充足的微血管生成以供应血液,微血管生成取决于血管生长激活因子和血管生长抑制因子两者平衡的精密调节。肿瘤细胞与基质细胞之间的沟通是通过包括各种生长因子、细胞因子、蛋白水解酶系统在内的复杂网络来实现的,这一过程的实现则紧紧依赖于组织的微环境。骨肉瘤是富含血管的肿瘤之一,手术后血行转移一直是临床治疗失败的重要原因。肿瘤新生血管不仅为肿瘤组织快速生长提供了物质基础,而且为肿瘤转移提供了新的门户。尽管血管形成的研究涉及多种实体瘤,但目前针对人骨肉瘤的报道国内外却较少,已有的研究也多限于人体组织标本的观察,对人骨肉瘤血管生成过程的特征性缺乏深入研究。我们以往的研究

表明人骨肉瘤组织中微血管密度及包括血管内皮生长因子、碱性成纤维细胞生长因子在内的多种生长因子及其受体的表达与临床转归具有相关性^[9]。我们的实验也发现人骨肉瘤细胞株 OS-732 具有较强的诱导血管生成能力,进一步研究发现其血管生成过程与多种血管生长因子的表达相关^[10]。因此进一步深入了解肿瘤微血管生成的分子机制,直接针对肿瘤血管生成的各个环节(如血管内皮细胞、基底膜、基质水解酶、胞外基质分子、血管生长因子及其受体等)选择合适的靶部位将为从抗微血管生成途径治疗骨肉瘤提供新的思路。

参考文献:

- [1] Folkman J, Shing Y. Angiogenesis[J] J Biol Chem, 1992, 267(3): 10931-4.
- [2] Komuro H, Kaneko S, Kaneko M. Expression of angiogenic factors and tumor progression in human neuroblastoma [J] J Cancer Res Clin Oncol, 2001, 127(12): 739-43.
- [3] 王东, 陈俐, 高奉浚, 等. 骨肉瘤中微血管密度与预后的关系 [J] 中华病理学杂志, 1997, 26(5): 266-9.
Wang D, Chen L, Gao FX, et al. Correlation of tumor microvessel density with prognosis in osteogenic sarcoma [J]. Chin J Pathol, 1997, 26(5): 266-9.
- [4] 付生法, 陆应麟, 张朝山, 等. 检测血管生长因子作用的鸡胚绒毛尿囊膜技术 [J] 军事医学科学院院刊, 1993, 17(4): 294-5.
Fu SF, Lu YL, Zhang CS, et al. Angiogenesis effect detected chick chorioallantoic membrane (CAM) technique [J]. Bull Acad Mil Med Sci, 1993, 17(4): 294-5.
- [5] Hori K. Characterization of heterogeneous distribution of tumor blood in the rat [J] Jpn J Cancer Res, 1991, 82(1): 109-17.
- [6] Jackson MW, Bentel JM, Tilley WD. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia [J] J Urol, 1997, 157(6): 2323-8.
- [7] Ng IO, Poon RT, Lee JM. Microvessel density, vascular endothelial growth factor and its receptors Flt-1 and Flk-1/KDR in hepatocellular carcinoma [J] Am J Clin Pathol, 2001, 116(6): 83-45.
- [8] Hemmerlein B, Kugler A, Ozisik R, et al. Vascular endothelial growth factor expression, angiogenesis, and necrosis in renal cell carcinoma [J] Virchows Arch, 2001, 439(5): 645-52.
- [9] 王东, 肖化亮, 李增鹏, 等. 骨肉瘤碱性纤维生长因子、转化生长因子及其受体表达与血管生成的关系 [J] 癌症, 1999, 18(2): 142-5.
Wang D, Xiao HL, Li ZP, et al. The expression of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor and their receptors in osteosarcoma and its relation to angiogenesis [J] Chin J Cancer, 1999, 18(2): 142-5.