

# 用免疫组化和原位杂交方法检测和分析人骨肉瘤组织中 I、II 和 III 型胶原蛋白和 mRNA 表达

张惠忠<sup>1</sup>, 丘距世<sup>2</sup>, 郝亚萍<sup>1</sup>, 曾敬<sup>1</sup>

**摘要:**目的 观察骨肉瘤组织 I、II 和 III 型胶原蛋白和 mRNA 的表达及其与骨肉瘤分型和分化的关系。方法 免疫组化 LSAB 法检测胶原蛋白, 原位杂交检测胶原 mRNA 的表达, 用图像分析系统进行分析和半定量测定。结果 骨肉瘤组织不仅表达 I 型胶原蛋白(阳性率 87%, 灰度值  $171.99 \pm 14.74$ ), 并出现了 II 型和 III 型胶原蛋白(阳性率分别为 30.4% 和 43.4%, 灰度值分别为  $153.07 \pm 18.82$  和  $168.29 \pm 18.36$ ); 软骨母细胞型和混合型骨肉瘤 II 型胶原的表达高于其它型, 差异有显著性( $P < 0.01$ ); 高中低分化的三组骨肉瘤间, I 型胶原表达差异有显著性( $P < 0.01$ ), 分化越低表达越少。I、III 型胶原 mRNA 表达与蛋白表达所得结论基本一致。结论 II 型胶原可作为软骨母细胞型和混合型骨肉瘤的分型参考指标, I 型胶原可作为骨肉瘤分化及恶性度判断的参考指标。

**关键词:** 骨肉瘤; 胶原; 免疫组织化学; 原位杂交

**中图分类号:** R 738.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2001)05-0345-03

## Study of Protein and mRNA of Type I、II and III Collagen in Human Osteosarcoma by Immunohistochemistry and in Situ Hybridization

ZHANG Hui-zhong, QIU Ju-shi, HAO Ya-ping, et al

Cancer Centre of Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510060, China

**Abstract:** **Objective** To investigate expression of type I、II and III collagen in human osteosarcoma and their relationship with classification and differentiation of osteosarcoma. **Methods** The protein and mRNA of type I、II and III collagen in 46 cases of osteosarcoma were detected using immunohistochemistry (LSAB) and in situ hybridization; EMAL-200 image software was used to analyse staining result. **Results** Besides type I collagen (positive rate 87%, grey value  $171.99 \pm 14.74$ ), there were also expression of type II and III collagen in osteosarcoma (positive rate are respectively 30.43% and 43.5%, grey value respectively  $153.07 \pm 18.82$  and  $168.29 \pm 18.36$ ); Type II collagen stain was significantly stronger in chondroblastic and mixed osteosarcomas than other type. Among three groups of osteosarcomas of high, moderate and low degree, the difference of type I collagen was statistically significant, the lower osteosarcoma differentiated, the weaker expression of type I collagen was. The ISH of mRNA revealed analogous change to protein. **Conclusion** Type II collagen can be utilized as one of referring indicators to identify chondroblastic and mixed osteosarcoma; Type I collagen can be used as one of markers to determine the differentiation and malignancy of osteosarcoma.

**Key words:** Osteosarcoma; Collagen; Immunohistochemistry; In situ hybridization

骨肉瘤是一种主要发生在青少年的恶性肿瘤, 恶性度高, 对青少年身体健康危害极大, 早期诊断和及时治疗非常重要; 同时, 寻找一些客观指标帮助进

行诊断和判断预后也是很有必要的。胶原是细胞外基质的主要成分, 近来的研究表明, 胶原除了作为结构蛋白对组织起支持作用外, 还具有复杂的生物学功能, 影响着细胞的分化, 增殖, 粘附, 形态发生和表型表达, 与肿瘤的浸润和转移也有关<sup>[1]</sup>, 因而越来越受到重视。正常骨组织中只有 I 型胶原, 软骨中主要是 II 型胶原。骨肉瘤发生后, 胶原的量及类型是否会

收稿日期: 2000-08-30; 修回日期: 2001-04-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 39770301)

作者单位: 1. 510060 广州, 中山医科大学肿瘤医院病理科; 2. 中山医科大学病理教研组



发生改变, 这种改变与骨肉瘤分类, 分化及预后是否有关, 本实验将就此类问题进行一些探讨。

1 材料和方法

收集 1992 年至 1996 年间中山医科大学病理教研室及肿瘤医院病理科人骨肉瘤石蜡标本 46 例, 男 28 例, 女 18 例, 年龄最大 67 岁, 最小 7 岁, 所有病例均经病理确诊。

免疫组化: 用 LSAB 法检测骨肉瘤组织中 I、

II 和 III 型胶原蛋白的表达情况; 主要试剂来源: I、III 型胶原抗体(兔抗人) 购自 BOSTER 公司, II 型胶原抗体(鼠抗人) 购自 NEOMARKER 公司, LSAB 检测试剂盒为 DA KO 公司产品; 对照设定: 用 PBS 代替一抗作为抗体的阴性对照, 用人皮肤和支气管软骨分别为 I、III 型及 II 型胶原的阳性对照。结果判定: 间质或细胞浆出现棕黄或深棕色染色者为阳性反应。

表 1 I、II 型胶原寡核苷酸探针序列

| 探针  | 特异性                 | 碱基序列                           | 碱基数 | Tm |
|-----|---------------------|--------------------------------|-----|----|
| C1  | α <sub>1</sub> (I)  | TCCGCGTA TCCA CAAA GCTGA GCA T | 25  | 64 |
| C2  | α <sub>1</sub> (II) | CGGGGCCCT TCTCCGTCT GACCCA GTC | 27  | 72 |
| C2a | α <sub>1</sub> (II) | TCGCA GCCTCCTGGACA TCCTGGC     | 24  | 70 |

说明: C2: 对人与鸡的 II 型胶原特异。C2a: 仅对人 II 型胶原特异。

原位杂交: 选择文献报道的 I、II 型胶原寡核苷酸<sup>[2]</sup>做探针(序列见表 1), 地高辛标记, 按常规 mR-NA 原位杂交法进行, 结果判断: 胞浆或胞核内出现紫蓝色为阳性。用 EMAL-200 真彩图像分析系统对免疫组化和原位杂交阳性染色的强度(灰度值)进行半定量测定, 灰度值与阳性强度成反比, 灰度值越小染色越强。

统计学分析: 计量资料组间比较用方差分析; 计数等级资料用秩和检验。

2 结果

2.1 免疫组化染色结果 骨肉瘤 I、II、III 型胶原表达阳性率分别为 87%、30.4% 和 43.4%。I 型与

III 型胶原分布基本相同, 主要在类骨质(钙化区不着色)或瘤细胞周围(呈细丝状), 软骨区基质中(特别是软骨区边缘成熟区)亦较多, 此外瘤细胞胞浆内也有阳性; II 型胶原主要分布在软骨区的基质中(特别是中央成熟区), 部分瘤细胞胞浆内也有表达。经图像分析测定免疫组化染色的灰度值并进行方差分析, 发现各型骨肉瘤间 I 型和 III 型胶原的表达差异无显著性, 而 II 型胶原以软骨母细胞型和混合型最强, 与其它型骨肉瘤比较差异有显著性; 在高、中、低分化的骨肉瘤之间, I 型胶原的表达差异有显著性(表 2), 即分化越高表达越强, 分化越低表达越弱, 而 II 型和 III 型胶原却无此差别。

表 2 I、II、III 型胶原免疫组化表达在三组不同分化程度骨肉瘤间的比较

| 分级   | n  | I          |                | II        |                | III       |                |
|------|----|------------|----------------|-----------|----------------|-----------|----------------|
|      |    | 阳性数        | 灰度值            | 阳性数       | 灰度值            | 阳性数       | 灰度值            |
| 高    | 15 | 15         | 157.38 ± 5.94  | 7         | 172.89 ± 26.03 | 9         | 183.58 ± 17.42 |
| 中    | 18 | 15         | 173.58 ± 12.61 | 5         | 183.06 ± 19.39 | 5         | 184.45 ± 17.61 |
| 低    | 13 | 10         | 186.59 ± 6.92  | 2         | 187.49 ± 20.96 | 6         | 184.11 ± 16.62 |
| F 检验 |    | F = 34.315 | P < 0.01       | F = 1.909 | P > 0.05       | F = 0.011 | P > 0.05       |

2.2 原位杂交结果

原位杂交以 NBT/BCIP 作底物, 在碱性磷酸酶作用下显紫色, I 型胶原 mRNA (C1) 和 II 型胶原 mRNA (C2, C2a) 既可在胞浆, 也可在核内, 因核未复染, 故部分细胞胞浆阳性而核不着色, 核的部分呈空泡状。

骨母细胞型, 纤维母细胞型和软骨母细胞型骨

肉瘤的 C1 阳性率均为 100%, 混合型为 80% (4/5); 各组间染色强度差异无显著性。C2 与 C2a 结果基本一致, 软骨母细胞型和混合型均为 100%, 而骨母细胞型和纤维母细胞型分别为 60% (6/10) 和 55.6% (10/18); 染色强度也以骨母细胞型和混合型最强, 与其它亚型间比较差异有极显著性 (P < 0.01)。

表 3 46 例骨肉瘤的分化程度与 C1、C2 和 C2a 表达的关系 (ISH)

| 骨肉瘤<br>分级 | 例数 | C1       |                | C2       |                | C2a      |                |
|-----------|----|----------|----------------|----------|----------------|----------|----------------|
|           |    | 阳性数%     | 灰度值            | 阳性数%     | 灰度值            | 阳性数%     | 灰度值            |
| 高分化       | 15 | 15(100)  | 151.32 ± 14.60 | 10(66.7) | 167.46 ± 26.45 | 9(60)    | 170.86 ± 24.46 |
| 中分化       | 18 | 17(94.4) | 159.93 ± 18.14 | 12(66.7) | 180.52 ± 16.26 | 13(72.2) | 182.46 ± 14.34 |
| 低分化       | 13 | 10(76.9) | 171.18 ± 20.43 | 8(61.5)  | 171.95 ± 22.32 | 7(53.8)  | 176.84 ± 20.5  |
| 合计        | 46 | 42(91.3) |                | 30(65.2) |                | 29(63)   |                |
| 方差分析      |    | F = 4.35 | P < 0.05       | F = 1.54 | P > 0.05       | F = 1.40 | P > 0.05       |

由表 3 可知, C1 的表达随骨肉瘤分化程度降低而减弱, 经两两比较, 低分化组与高分化组骨肉瘤间 C1 表达强度差异显著, 而中分化组与高、低分化组间差异无显著性。C2 与 C2a 的表达在高、中、低分化组间差异无显著性。

### 3 讨论

I 型胶原的产生是骨母细胞分化、代谢的标志之一, 正常骨小梁中只有 I 型胶原, 骨肿瘤发生后, 共胶原产生的量和形态都发生变化。有人曾发现<sup>[3]</sup>, 转化后的骨肉瘤细胞株  $\alpha 1(I)$  mRNA 水平下降, 而胶原受体— $\alpha 2\beta 1$  整合素却相应增加, Oshim a<sup>[4]</sup> 将人成骨肉瘤细胞种植到裸鼠, 长出的肿瘤与人软骨肉瘤相同, 瘤细胞产生 I 型和 II 型胶原 mRNA, 说明细胞转化后, 胶原在转录水平受到调节。本小组曾对骨肉瘤细胞株 OS-732 和 HOS-863 进行研究, 发现转化后细胞中  $\alpha 1(I)$  mRNA 水平和前胶原多肽合成明显减少。本次实验结果显示, 对照的人体骨瘤组织的胶原量和排列基本正常, 均为 I 型胶原, 而骨肉瘤 I 型胶原的量明显减少, 形态排列不规则, 此外还出现了 II 型和 III 型胶原, 说明骨肉瘤胶原基因表达发生改变; Ueda 等<sup>[5]</sup> 用免疫组化方法检测 6 例软骨瘤和 9 例软骨肉瘤, 发现软骨瘤基质中无 I、III 型胶原, 而软骨肉瘤中却出现了 I 型和 III 型胶原, Lehmann<sup>[6]</sup> 对 4 例骨肉瘤的研究发现都 (4/4) 含较高的 III 型胶原, 其中 3 例的 I、III 型胶原都有过度修饰, 这也说明肿瘤恶性变后胶原基因表达异常。

有关胶原表达与骨肉瘤分型和分化的关系, 尚未见文献报道。本研究结果表明, I 型和 III 型胶原的表达与骨肉瘤类型无明显相关, 而 II 型胶原在软骨母细胞型和混合型中的表达明显高于其它型骨肉瘤, 因此可作为该两型骨肉瘤分型的参考指标。高、中、低分化的三组骨肉瘤间 I 型胶原的表达差异有

显著性, 即分化越低, I 型胶原表达越弱, 而 II、III 型胶原却没有发现这种相关, 由于骨肉瘤分化程度与其恶性度有关, 因此 I 型胶原可作为判断骨肉瘤分级(分化)和恶性程度的参考指标。因常规 HE 形态分类和分级主观性大, 而本实验方法可以确定胶原的类型并进行半定量, 因而更为敏感和准确。

I、II 型胶原 mRNA 原位杂交所得结论与蛋白免疫组化结论一致, 说明骨肉瘤胶原的改变可能发生在转录或转录前, 因此, 研究骨肉瘤胶原基因结构及其调控机制的变化将是一个非常重要的课题。

### 参考文献:

- [1] Vihinen P, Riihonon T, Lain A. Integrin alpha 2 beta 1 in tumorigenic human osteosarcoma cell line regulates cell adhesion [J]. Cell Growth Differ, 1996, 7(4): 439-447.
- [2] Crabb D, Hughes SS, Hichs DG, et al Nonradioactive in situ hybridization using digoxigenin-labelled oligonucleotides [J]. Am J Pathol, 1992, 141(3): 579-589.
- [3] Santala, P Larjava H, Nissinen L, et al Suppressed collagen gene expression and induction of  $\alpha 2\beta 1$  integrin-type collagen receptor in tumorigenic derivatives of human osteogenic sarcoma (HOS) cell line [J]. J Bio Chem, 1994; 269(2): 1276-1283.
- [4] Oshim a O, Haraki T, Kakuta S, et al Expression of collagen species in a cartilaginous tumor derived from a human osteogenic sarcoma [J]. Calcif Tissue Int, 1994, 54(6): 516-520.
- [5] Ueda Y, Oda Y, Tsuchiya H, et al Immunohistological study on collagenous protein of benign and malignant human cartilaginous tumors of bone [J]. Virchow s Arch (A), 1990, 417(4): 291-297.
- [6] Lehmann HW, Wolf E, Roser K, et al Composition and post-translational modification of individual collagen chain from osteosarcoma and osteofibrous dysplasia [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 1995, 121(7): 413-418.

(李奇明校对)