

# BMP-2,3,4,5 在颌面部神经鞘瘤中的表达分析

金 岩 吕红兵 Tipoe CL 李 媛

**摘要** 目的:探讨 BMPs 家族成员与外周神经肿瘤的关系。方法:用原位杂交方法对 BMP-2,3,4,5 在人良、恶性神经鞘瘤中的表达进行观察。结果:显示 BMP-2,3,4,5 mRNA 在外周神经的良恶性神经鞘瘤中均有分布。良性肿瘤中,呈栅栏状排列,肿瘤细胞聚集的区域 BMPs 表达升高;恶性肿瘤中 BMPs 的表达高于良性肿瘤。结论:确定了 BMPs 在外周神经肿瘤中的表达和分布,揭示部分 BMPs 可能参与了外周神经肿瘤的发生发展过程。

**关键词** BMP 神经鞘瘤 恶性 原位杂交

## Analysis of the Expression of BMP-2,3,4,5 in Nerve Sheath Tumors of Maxillofacial Region

Jin Yan, Lu Hongbing, Li Yuan

Department of Oral Histology and Pathology, Stomatology College of the Fourth Military Medical University

Tipoe CL

Department of Anatomy, Faculty of Medicine, the University of Hong Kong

### Abstract

**Objective:** The aim of present study is to elucidate the relationship between the members of BMP family and the neoplasms of peripheral nerve. **Methods:** Eight cases of schwannoma and three cases of malignant schwannoma were collected and all samples were fixed with 10% neutral formalin and embedded in paraffin wax. Five  $\mu$ m thickness sections were prepared for staining with haematoxylin and eosin for histopathological assessment and processed for in situ hybridization for assessing the mRNA transcriptions of BMP-2,3,4,5. Sections of osteosarcoma that previously demonstrated consistent expression of BMP2 mRNA were included in each batch of staining to serve as positive control. **Results:** The results showed that all of the neoplastic lesions of nerve sheath showed a consistent expression of BMP2,3,4,5. The positive signals of benign lesions were obviously increased in the palisading area or the area of accumulated cells. There was no detectable staining in the matrix of tumour and collagenous fiber. The staining intensity was relatively and slightly weak in cells of Antoni B tissue when compared with Antoni A tissue. Nevertheless, the tumour cells in Antoni B tissue also showed BMP2,3,4 and 5 positively staining. The fibroblasts of schwannoma were negatively stained. The malignant lesions showed higher expression signals of BMPs than benign lesions. **Conclusion:** The results can be concluded that the selected members of BMPs may be involved in the process of growth and progression of the neoplasms of peripheral nerve.

**Key words:** BMP nerve sheath tumor malignant in situ hybridization

骨形成蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 是最早在观察骨的异位生长和骨诱导中发现的一种生长因子<sup>1</sup>。BMP 是否在外周神经肿瘤中表达,目前尚未见文献报道。为此,本研究对部分 BMP 家族成员在颌面部良恶性神经鞘瘤中的表达情况进行了观察和分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 标本

选用第四军医大学口腔医院病理科收集的颌面部神经鞘瘤标本 8 例;恶性神经鞘瘤 3 例。患者年龄为 25~64 岁。所有标本均为 10% 福尔马林液 (体积分数) 固定、石蜡包埋,切片厚 5 $\mu$ m。部分切片行常规 HE 染色,用于原位杂交的切片于 65℃ 烤箱过夜。

### 1.2 探诊和标记

含人源性 BMP-2 cDNA 片段 (1.58 kb) 的 pSP65-BMP2 cD-

作者单位:710032 第四军医大学口腔医学院组织病理学教研室(金岩,吕红兵,李媛),香港大学医学院解剖学系(Tipoe CL)

NA 质粒和含人源性 BMP-3 cDNA (780bp) 的 PGEX-2T-BMP3 质粒, 含人源性 BMP-4 cDNA 片段 (1.8kb) 的 Bluescript KS-BMP4, 含人源性 BMP-5 cDNA 片段 (246bp) 的 pBmp5UT, 上述 BMPs cDNA 片段的标记按照 DIG-标记试剂盒的随机引物标记法 (DIG Labeling Kit, BOEHRINGER MANNHEIM Biochemical) 进行。

1.3 原位杂交方法步骤

上述不同 BMPs 的原位杂交染色方法和条件相同。石蜡切片经常规脱蜡至水及 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) (pH7.4) 后, 经 0.2 mol/L HCl 和蛋白酶 K 处理, 梯度酒精脱水后室温干燥组织片。42 分别加 BMP-2, 3, 4, 5 标记探针杂交 20 h 后, 分别经 2 ×SSC (标准枸橼酸盐缓冲液, standard saline citrate, SSC)、1 ×SSC、缓冲液、缓冲液依次充分洗涤。正常羊血清封闭后, 滴加抗 Dig-AP 抗体复合物 2 h (37 ) , 经缓冲液、缓冲液洗涤后用显色液 (为缓冲液 1000μl、左旋米唑 0.24 mg、NBT 4.5μl 及 BCIP 3.5μl) 暗处显色 2 h, TE 液 (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 终止反应, 部分切片用甲基绿衬染胞核, 常规脱水透明封片。

实验对照为除去探针的空白对照及 RNase 消化对照。阳性对照分别为骨肉瘤和软骨肉瘤标本。

2 结 果

观察的神经鞘瘤可见典型的栅栏样结构和肿瘤细胞聚集区, 其中有 2 例标本出现粘液变。原位杂交染色结果显示, BMP-2, 3, 4, 5 mRNA 在 8 例观察的神经鞘瘤中均有表达, BMP-2, 3, 4, 5 在神经鞘瘤中的表达方式基本相似, 几乎所有的梭形肿瘤细胞的胞浆中均可见强弱不一的阳性表达 (图 1), 在典型的栅栏样结构和肿瘤细胞聚集区阳性染色程度明显高于其它区域 (图 2, 3)。肿瘤间质中未见阳性着色。在出现粘液变性的肿瘤组织中, 肿瘤细胞仍见 BMP-2, 3, 4, 5 的阳性着色, 但其阳性程度弱于未出现粘液变性区。观察恶性神经鞘瘤的染色情况, 也显示 BMP-2, 3, 4, 5 均有程度不一的表达 (图 4), 其中 BMP-2 的阳性表达程度最高, 几乎所有的肿瘤细胞均见 BMP-2 的表达 (图 5, 6)。

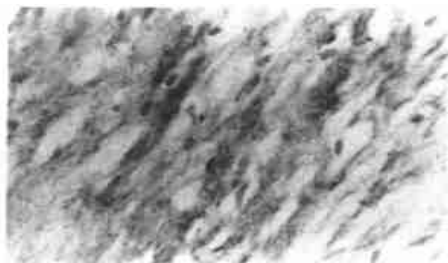


图 1 BMP4 mRNA 在神经鞘瘤中的阳性表达 原位杂交 ×40



图 2 神经鞘瘤, 示 BMP2 mRNA 在栅栏样排列的肿瘤细胞中的强阳性表达 原位杂交 ×40



图 3 神经鞘瘤, 示 BMP5 在肿瘤细胞聚集区的阳性表达 原位杂交 ×40

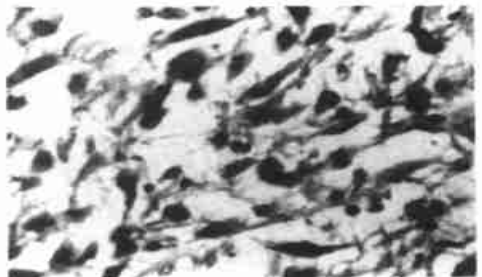


图 4 示 BMP4 mRNA 在恶性神经鞘瘤肿瘤细胞胞浆中的阳性表达 原位杂交 ×40

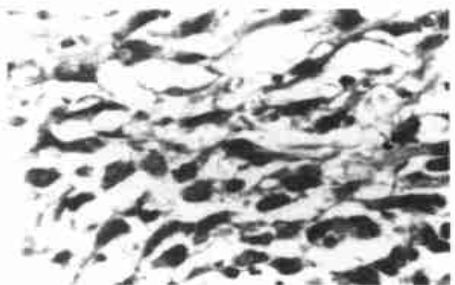


图 5 恶性神经鞘瘤, 示 BMP2 在肿瘤细胞胞浆中的阳性表达 原位杂交 ×40

3 讨 论

本结果明确了 BMP-2, 3, 4, 5 在外周神经肿瘤中的表达和分布, 发现 BMP-2, 3, 4, 5 mRNA 均以一定的程度在颌面部良、恶性神经鞘瘤的肿瘤细胞中表达, 并揭示了 BMPs 可能在外周神经肿瘤的发生发展以及恶性变中发挥着重要作用。良性神经鞘瘤的组织

学来源是神经鞘的雪旺氏细胞。有学者<sup>2~4</sup>的研究发现,部分 BMPs 可以促进星形胶质细胞的蛋白合成与分化,认为 BMPs 可能具有神经营养的作用,BMPs 可以刺激胶质细胞合成及释放胶质细胞来源的神经营养因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)。本研究结果显示了来源于雪旺氏细胞的肿瘤细胞可以表达 BMP-2,3,4,5,表达的 BMPs 可能参与了肿瘤细胞的生长,进一步揭示了部分 BMPs 可能在外周神经的生理病理状态下发挥作用。

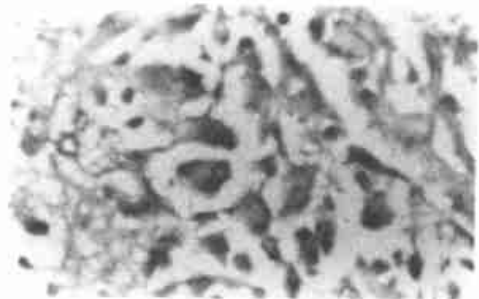


图6 恶性神经鞘瘤,示 BMP3 mRNA 在肿瘤细胞浆中的阳性表达 原位杂交,未衬染 ×40

Lo 等<sup>5,6</sup> 在研究中发现,BMP-2,4 可以促进神经嵴干细胞的自主神经元分化。Mabie 等<sup>3</sup> 发现,BMP-2 的表达随着胶质细胞的增生也相应地升高。Hattori 等<sup>7</sup> 的研究发现,BMP-2 与肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 协同作用,刺激 3T3 成纤维细胞表达神经生长因子。Iwasaki 等<sup>8</sup> 发现,BMP-2 可以刺激 PC12 细胞向神经元细胞分化,细胞受刺激后出现 3 种神经丝蛋白的表达。笔者认为,BMP-2,4 可能为另外一种神经营养因子,以自分泌和旁分泌的方式不仅在维持调节外周神经的健康和再生中发挥一定的作用,而且可能参与了外周神经肿瘤的发生发展。尽管多数恶性神经鞘瘤并不是来源于良性神经鞘瘤,但是,在部分恶性神经鞘瘤中仍能找到神经鞘瘤的病理学特征,这也是恶性神经鞘瘤诊断的一个重要依据。本研究发现,BMPs 在无论是良性还是恶性神经鞘瘤中都有表达,从良性到恶性的变化中,BMPs 表达的变化并不呈均一性,以 BMP-2 的升高为明显。本研究结果显示,在神经鞘瘤的发生和生长中,部分 BMPs (如 BMP-2,4) 可能出现过表达,并进一步影响肿瘤的生长。

在部分良性神经鞘瘤中可以发现病理性的骨或软骨组织,对于 BMPs 是否与这种病理学骨或软骨

组织的形成有关尚没有直接的证据。但是,由于 BMPs 是一种扩散性的生长因子,因而,笔者推测,良性神经鞘瘤的肿瘤细胞所合成和表达的 BMPs,在组织局部间质中积聚到一定的程度后可以诱导肿瘤间质中的未分化间充质细胞分化为骨或软骨组织。

由于不同的 BMPs 在不同的时期对于不同的细胞可能发挥着选择性的作用,因而对于不同的 BMPs 家族成员在良性外周神经鞘瘤的发生发展中究竟如何发挥作用、相互之间的关系、与其它因子的作用如何进行协调,BMPs 的表达程度与良性神经鞘瘤预后的关系都有待于进一步研究。

### 参考文献

- 1 Kingsley DM. The TGF superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev*, 1994,8(1):133~146
- 2 Mehler MF, Mabie PC, Zhang D, et al. Bone morphogenetic proteins in the nervous system. *Trends Neurosci*, 1997,20(3):309~317
- 3 Mabie PC, Mehler MF, Marmor R, et al. Bone morphogenetic proteins induce astroglial differentiation of oligodendroglial-astroglial progenitor cells. *J Neurol Sci*, 1997,17(11):4112~4120
- 4 Jordan J, Bottner M, Schuluesener HJ, et al. Bone morphogenetic proteins: neurotrophic roles for midbrain dopaminergic neurons and implications of astroglial cells. *Eur J Neurosci*, 1997,9(8):1699~1709
- 5 Lo L, Sommer L, Anderson DJ. MASH1 maintains competence for BMP2-induced neuronal differentiation in post-migratory neural crest cells. *Curr Biol*, 1997,7(6):440~450
- 6 Varley JE, Maxwell GD. BMP-2 and BMP-4, but not BMP-6, increase the number of adrenergic cells which develop in quail trunk neural crest cultures. *Exp Neurol*, 1996,140(1):84~94
- 7 Hattori A, Tsujimoto M, Hayashi K, et al. Bone morphogenetic protein2 is markedly synergistic with tumor necrosis factor in stimulating the production of nerve growth factor in fibroblasts. *Biochem Mol Biol Int*, 1996,38(6):1095~1101
- 8 Iwasaki S, Hattori A, Sato M, et al. Characterization of the bone morphogenetic protein2 as a neurotrophic factor. Induction of neuronal differentiation of PC12 cells in the absence of mitogen activated protein kinase activation. *J Biol Chem*, 1996,271(29):17360~17365

(1998-09-16 收稿,2000-07-18 修回)

(本文编辑 王 晴)