

鸡破骨细胞分离培养方法的建立

史凤芹 于世凤 庞淑珍

摘要 为了寻找一种获得大量、纯化、有活力的破骨细胞的方法,我们对已经建立的兔破骨细胞体外分离培养方法的基础上加以改进。利用冲洗的方法,从28天的鸡的长骨中得到细胞团1破骨细胞后,又对鸡的长骨相继进行胶原酶和胰蛋白酶的消化,得到细胞团2和细胞团3破骨细胞。将这些分离的细胞与盖玻片或骨磨片共同培养,通过相差显微镜观察到:这些分离的多核巨细胞能够运动,并能在骨磨片上形成吸收陷窝。另外,这些细胞对酸性磷酸酶染色呈阳性反应,而酸性磷酸酶是鉴别破骨细胞的标志。表明此分离培养鸡破骨细胞的实验技术是成功的,通过此方法获得的鸡破骨细胞比用以往方法获得的兔破骨细胞量多,且活力强。本方法的建立,为进一步研究骨吸收机理奠定了基础。

关键词 骨质吸收 破骨细胞,培养的

The establishment of a method of isolated and cultured chicken osteoclasts

Shi Fengqin, Yu Shufeng, Pang Shuzhen.

Department of oral pathology, School of Stomatology,

Beijing medical university, Beijing 100081

Abstract In this study, in order to obtain large numbers of pure and viable osteoclasts, we improved the method of isolated and cultured rabbit osteoclasts. The osteoclastic population 1 were obtained from 28-day old chicken long bones by flushing the marrow cavities repeatedly. The bones were then treated successively with collagenase and trypsin. The osteoclastic population 2 and population 3 were obtained. These isolated cells were cultured on glass or bone slices. Under phase-contrast microscope, it has been found that these isolated multinucleated giant cells can migrate and generate resorption lacunae on bone slices. In addition, these cells stained positively for acid phosphatase which are marker for osteoclasts. These results suggested that the procedure of isolation of osteoclasts from the long bones of chicken was successful. The numbers of chicken osteoclasts are larger than those obtained by this method than rabbit osteoclasts obtained by old method. The vitality of the chicken osteoclasts are stronger. This method lays a foundation for further study of pathogenesis of bone resorption.

Key words Bone resorption Osteoclast culture

我们已经引进和建立了体外兔破骨细胞分离培养的方法^[1],但由于此方法分离出的破骨细胞量少,且不够纯化。因此,影响了对破骨细胞的深入研究,尤其是分子生物学研究。许多国外学者采用各种单核细胞前体合成巨细胞的方法,试图用巨细胞代替破骨细胞^[2-4]。但巨细胞与破骨细胞间存在着许多差别,从而限制了对真正破骨细胞生物学活性的研究。我们利用鸡

的长骨分离破骨细胞,旨在寻找一种获得大量、纯化、有活力的破骨细胞的方法,为进一步研究破骨细胞的分子生物学活性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物:Leghorn 鸡。

1.1.2 药品及试剂:(1)EAGLE 培养基(D-MEM)(Gibco Laboratories, USA);(2)胶原酶(Collagenase Type II, Sigma Chemical 公司产品);(3)EDTA (Sino-American Biotechnology 公司产品);(4)胰蛋白酶(Trypsin, Sino-Amer-

本文为国家自然科学基金资助重点项目

作者单位:100081 北京医科大学口腔医学院病理研究室

ican Biotechnology);胎牛血清(浙江省金华市清湖犍牛利用研究所出品);(6)HEPES(Sino-American Biotechnology 公司产品);(7)青霉素、链霉素(华北制药厂产品)。

1.2 方法

1.2.1 鸡破骨细胞的分离:15只Leghorn鸡,小米喂养28天,无痛处死。下列步骤均在冰上进行。无菌条件下取其股骨和胫骨,去净附着在骨表面的软组织及软骨髓,在无钙、镁的Tyrode's平衡盐溶液中,将骨干及干骺端纵行剖开,轻刮骨的内表面,并用尖吸管吸Tyrode's平衡盐溶液反复冲洗骨髓腔,如此产生的细胞为细胞团1细胞。然后,骨干及干骺端放入0.5mg/ml的胶原酶/TBSS中,37℃,30分钟。象细胞团1细胞那样反复冲洗骨髓腔,获得的细胞我们称为细胞团2细胞。经胶原酶处理的骨再放入含225μg/ml胰蛋白酶和0.015%DETA的无Ca²⁺、Mg²⁺TBSS中,37℃,30分钟。然后,加入1ml胎牛血清终止胰蛋白酶的作用,像前述方法一样彻底清洗骨髓腔,从这一步所得的细胞为细胞团3细胞。上述三团细胞分别用D-MEM清洗离心一次,2000转/分,10分钟/次。最后各加入8mlD-MEM,吹匀细胞,备用于实验。

1.2.2 盖玻片的处理:将盖玻片用玻璃刀分切成1cm×1cm大小,洗衣粉水浸泡洗涤,再浸入硫酸钾清洁液中过液,充分水洗,蒸馏水洗,擦干,高压消毒灭菌。

1.2.3 骨磨片的制备与处理:取新鲜的牛股骨,用钢齿锯和金刚砂片将骨皮质分切成约6mm×6mm、厚约200μm的小片,再用粗细不同的金刚砂石将其磨成厚度约10μm,以便于在相差显微镜下观察。使用前所有的骨磨片均置蒸馏水中,在超声波清洗器内超声处理三次,每次5分钟,以洗净骨片。然后浸泡于含抗菌素(青霉素1000U/ml、链霉素1mg/ml的D-MEM中,更换三次培养液,每次20分钟,以达到消毒灭菌的目的。

1.2.4 破骨细胞的培养:取无菌24孔培养板2个,每孔加1mlD-MEM,其中一个培养板的

每孔加入一个处理过的盖玻片,另一个培养板的每孔加入一个处理过的骨磨片,置二氧化碳孵育箱内1小时。然后,分别加入上述分离的三群细胞悬液,每孔0.5ml(各群细胞分别加入到含盖玻片的8个孔及含骨磨片的8个孔中),5%CO₂、37℃潮湿条件下继续培养。隔夜,用D-MEM冲掉未附着于盖玻片或骨片上的细胞(主要是红细胞),继续培养。

1.2.5 破骨细胞的鉴定:(1)相差显微镜观察培养细胞的形态及运动情况,观察这些细胞是否能在骨片上形成吸收陷窝及陷窝的变化。(2)HE染色:生长有细胞的盖玻片于培养1周取出,80%乙醇固定,HE染色,脱水,二甲苯透明,树胶封固,光镜观察。(3)Giemsa染色:生长有细胞的盖玻片甲醇固定10分钟,Giemsa染液染15分钟,自来水冲去盖片上多余的染料,空气干燥,二甲苯透明,树胶封固,光镜观察。(4)酸性磷酸酶染色:将上述细胞爬片入酸性磷酸酶作用液中,37℃孵育2小时,蒸馏水冲洗,入1%硫化铵水溶液中1分钟,自来水冲洗数分钟,脱水、透明、封固。(5)碱性磷酸酶染色:将上述细胞爬片入新配制的碱性磷酸酶孵育液中,37℃2小时,流水冲洗5分钟,入2%硝酸液中5分钟,蒸馏水洗,入0.5%硫化铵中1分钟。自来水冲洗数分钟,脱水、透明、封固。

2 结果

2.1 破骨细胞运动状态的观察:细胞团1、细胞团2、细胞团3细胞加入到含盖玻片的培养板中后,培养两小时左右,多数细胞贴附到盖玻片上。通过相差显微镜观察到:三团细胞中,细胞团1细胞量最多,但较杂,尤其是红细胞含量很大;细胞团2细胞次之,除多核细胞外,尚含很多单核细胞;细胞团3细胞量较少,多为多核细胞。冲掉未附着在盖玻片上的细胞后,观察到细胞团1、细胞团2中多核细胞较多,但较圆,胞浆活动能力较差,尚见较多的成纤维细胞及单核细胞,随着培养时间的增加,成纤维细胞分裂、生长迅速,更限制了破骨细胞的运动。细胞团3中多核细胞虽相对量少,但其运动能力较强,胞浆伪足样运动活跃,由于其胞浆的不断运

动,使细胞外形不断地变化。细胞团3中其它细胞较少。

2.2 骨吸收陷窝的观察:细胞团1、细胞团2、细胞团3细胞与骨片共同培养1天后,均见有吸收陷窝形成,开始多为单个圆形或椭圆形,随着培养时间的增加,吸收陷窝也不断地增加,尤其是细胞团3细胞形成的吸收陷窝的增加速度更快,由开始的单个圆形到最后连接成串珠状。培养1周后,吸收陷窝的增加速度减慢或停止。

2.3 破骨细胞的组织形态学观察:生长有细胞的盖玻片经HE染色,观察到破骨细胞的多个细胞核非常明显,核的数量不等,由几个到几十个,染色质颗粒细小,分布均匀,着浅蓝色,每一个核含1~2个核仁,胞浆呈浅粉色,泡沫状,周围可见许多伪足样胞浆突起。Giemsa染色也观察到了多核的破骨细胞,核呈蓝紫色,胞浆中可见大小不等的空泡,周围胞浆不规则突起。酸性磷酸酶染色见成堆的破骨细胞呈阳性反应,多个细胞核呈深棕色,核仁为黑色,胞浆呈棕黄色,其内见许多深棕色的酶原颗粒。碱性磷酸酶染色呈阴性反应。

3 讨 论

破骨细胞是来源于生血干细胞的多核巨细胞,在骨吸收中起关键作用。然而,由于很难从骨组织中纯化出破骨细胞,所以,阻碍了对破骨细胞的研究。近几年,尽管已经建立了几种动物的破骨细胞体外分离培养方法,并且对破骨细胞的机能和调节也作了一些研究^[5,6],但一直没有解决如何获得大量、纯化、有活力的破骨细胞的问题。因而,对破骨细胞的深入研究,尤其是分子生物学及生物化学方面的研究受到了限制。

在我们已经建立的兔破骨细胞分离培养方法的基础上,又从鸡的长骨中分离出多核巨细胞。在培养过程中,利用相差显微镜观察到这些多核巨细胞的胞浆不断地进行伪足样运动。把这些细胞与牛骨片共同培养,观察到这些细胞可以吸收骨,在骨片上形成吸收陷窝。并且,这些多核巨细胞对酸性磷酸酶呈阳性反应。这些都证明我们从鸡的长骨中分离出的多核巨细胞

是破骨细胞。

从本研究获得的鸡破骨细胞量比兔破骨细胞量多,尤其是有活力的破骨细胞量多。这可能是因为越是活力强的破骨细胞,附着到骨的内表面越牢。象我们过去分离兔的破骨细胞那样,单纯用冲洗的方法,很难将活力强的破骨细胞冲洗下来,而得到的破骨细胞就象本研究中的细胞团1细胞那样,虽然破骨细胞的量也较多,但多为无活力的或活力较弱的。我们对已建立的兔破骨细胞分离培养方法加以改进,利用冲洗的方法得到细胞团1细胞后,又对鸡的长骨相继进行胶原酶和胰蛋白酶的消化,得到了细胞团2和细胞团3细胞。虽然其量较细胞团1细胞少,但其活力很强,运动活跃,形成的骨吸收陷窝多。总之,本研究所得到的破骨细胞总量要比用以往方法得到的破骨细胞量多,相当于多出细胞团2和细胞团3细胞,且这两团细胞的活力很强。

本研究方法的建立,为进一步研究骨吸收机理奠定的基础。但本方法所得到的破骨细胞仍不够纯化,还混杂有少量的成纤维细胞和单核细胞,尚需进一步改进。

参 考 文 献

- 1 史凤芹,于世凤. 体外破骨细胞分离培养方法的建立. 中华骨科杂志,1994,14:43.
- 2 Roodman GD, Ibbotson KJ, MacDonald BR, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ causes formation of multinucleated cells with several osteoclast characteristics in cultures of primate marrow. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82: 8213.
- 3 Fallon MD, Teitelbaum SL, Kahn AJ. Multinucleation enhances macrophage-mediated bone resorption. Lab Invest, 1983, 49: 159.
- 4 Suda T, Testa NG, Allen TD, et al. Effects of hydrocortisone on osteoclasts generated in cat bone marrow cultures. Calcif Tissue Int, 1983, 35: 82.
- 5 Oursler MJ, Pederson L, Pyfferoen J, et al. Estrogen modulation of avian osteoclast lysosomal gene expression. Endocrinology, 1993, 132: 1373.
- 6 Fenton AJ, Martin TJ, Nicholson GC. Carboxyl-terminal parathyroid hormone-related protein inhibits bone resorption by isolated chicken osteoclasts. J Bone Min Res, 1994, 9: 515.