

体外培养的破骨细胞细胞化学测量观察

王连唐 郑铭豪

摘要 本文采用 Sprague-Dawley 大鼠体外破骨细胞培养及新鲜长骨组织破骨细胞印片方法研究两种材料中破骨细胞细胞化学的异同,检测了酸性磷酸酶(ACP)抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)、 β -酸性半乳糖苷酶、 β -葡萄糖醛酸酶、乳酸脱氢酶、琥珀酸脱氢酶、NADH 和 NADPH 脱氢酶,并使用 Zeiss 氏细胞扫描显微镜连接 CD/MD20 电脑图像分析系统,定量检测了以上酶的活性,结果表明,大鼠体外培养和新鲜组织印片的破骨细胞含有丰富的多种溶酶体酶和厌氧脱氢酶(线粒体酶),新鲜组织印片的破骨细胞大多数脱氢酶的活性高于体外培养的破骨细胞。

关键词 鼠破骨细胞 细胞化学 溶酶体酶 骨吸收

Quantitative cytochemical investigation of cultured osteoclasts *in vitro*

Wang Liantang and Zheng Minghao

Department of Orthopaedic Surgery, QE 11 Medical Centre, University of Western Australia, Netherlands 6009, Australia

Department of Pathology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, P. R. China

Abstract: Osteoclasts are multinuclear cells formed by the fusion of marrow monocyte-granulocyte lineage. In isolated osteoclast culture system, osteoclasts have a very short life span and osteoclast precursor cells are unable to form multinuclear osteoclasts in culture. It appears that they are somewhat different in their cellular metabolism after osteoclasts are isolated from bone, apart from the changes in the microenvironment. Therefore, the aim of this study was to address the cytochemical differences between the cultured and "in vivo" osteoclasts using quantitative cytochemistry. The results have indicated that osteoclasts from cultured and imprinted preparations express ACP, TRACP, β -acid galactosidase, β -glucuronidase, lactate dehydrogenase, succinate dehydrogenase, NADH dehydrogenase, and NADPH dehydrogenase. Both cultured and imprinted "in vivo" osteoclasts contain an abundance of various lysosomal and anaerobic dehydrogenase enzymes for bone resorption but activities of most dehydrogenase in cultured osteoclasts are lower than in imprinted osteoclasts.

Key Words: Osteoclast Cytochemistry Lysosomal enzyme Bone resorption

破骨细胞是由骨髓单核细胞前体融合形成的多核骨吸收细胞^[1],在骨代谢性疾患及某些溶骨性疾病的骨吸收及骨质破坏中起重要作用,深入研究破骨细胞的生物学行为,将有助于对骨质吸收及骨质破坏机理的认识。自1982年 Chambers、Osdoby 和 Zamboni 等分别从大鼠、鸡、鸡胚长骨中分离出破骨细胞体外培养成功以来^[2~4],这一方法被广泛地应用于破骨细

胞的生物学研究。由于破骨细胞体外培养困难,细胞数量少,存活时间短^[2~4],因而检测体外培养破骨细胞的生化特性十分重要。本研究由大鼠长骨分离培养的破骨细胞与新鲜大鼠骨组织印片的破骨细胞应用细胞化学方法比较了体内及体外破骨细胞的生物学特性。

1 材料和方法

1.1 材料:SD 大鼠由西澳大利亚标准实验动物中心获得。Hank's 平衡盐缓冲液,199培养基及 EMEM 培养基均购自 ICN-Flow, Labora-

torise (U. K), AS-BI 磷酸酶和 6-P-甲基品红 (Hexa20-P-rosaniline) 购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1. 破骨细胞印片: 由日龄雄性 SD 大鼠分离出破骨细胞, 纵向劈开长骨 (胫骨, 股骨, 肱骨), 放入冷 Hank's 液中, 置洁净玻片上轻压, 玻片置 4°C 30 分钟自然风干^[5]。

1.2.2. 破骨细胞的分离培养: 剥离附着于长骨的软组织, 在骨髓处横向切开, 然后纵向劈开, 在含 10% 胎牛血清、谷氨酸、青霉素和链霉素的 199 培养基中, 将骨切成小碎片, 用加样器吸取细胞悬液, 置于细胞培养板室 (chamber slide) 孔中, 37°C 孵育 40 分钟后, 用不含胎牛血清的 EMEM 培养基洗去不粘附的非破骨细胞, 破骨细胞在含 10% 胎牛血清的 EMEM 培养基中孵育 (5% CO₂, pH 7.3) 过夜。第二天进行细胞化学分析^[5]。

1.2.3. 酶细胞化学检测: 使用 AS-BI 磷酸酶和 6-P-甲基品红 (Hexa20-P-rosaniline) 检测酸性磷酸酶 (ACP) 和抗酒石酸酸性磷酸酶 (TrACP)。使用 Zheng 描述的方法检测 β -酸性半乳糖苷酶 (β -acid galactosidase)^[5], 使用 Hayashi 描述的方法检测 β -葡萄糖醛酸酶 (β -glucuronidase) 的活性^[6]。使用 Bancroft 的方法检测乳酸脱氢酶, 琥珀酸脱氢酶, NADH 和 NADPH 脱氢酶^[7,8], 培养基中缺乏相应的底物的标本作阴性对照。所有酶反应均为 60 分钟。

1.2.4. 定量细胞化学检测: 使用 Zeiss 氏细胞扫描显微镜连接 1 台 CD/MD 20 电脑图像分析系统 (Leading edge, Australia), 在单色光照下根据光吸收量测定不同的细胞化学反应, 单色光的波长根据不同的检测项目而不同, 517nm 用于 ACP 和 TRACP 检测, 575nm 用于 β -酸性半乳糖苷酶检测, 520nm 用于 β -葡萄糖醛酸酶检测, 545nm 用于 NADH, NADPH 脱氢酶、乳酸脱氢酶和琥珀酸脱氢酶, 随机选择玻片和细胞, 在细胞轮廓完全看到时提取读数。

2 结果

2.1 培养破骨细胞的细胞化学测定: 反应产物

TRACP (图 a), ACP (图 b) 和 β -葡萄糖醛酸酶 (图 c) 弥漫地分布于整个胞浆, 刷状缘及胞核几乎不着色; β -酸性半乳糖苷酶产物呈天蓝色, 沉积在胞浆中央 (图 d), NADH 脱氢酶 (图 e), NADPH 脱氢酶 (图 f), 乳酸脱氢酶 (图 g) 和琥珀酸脱氢酶 (图 h) 均相似, 它们的产物呈黑蓝色分布在整個胞浆, 胞核不染色。

2.2 培养和印片中破骨细胞不同酶活性比较: 结果表明, TRACP, ACP, β -半乳糖苷酶和 β -葡萄糖醛酸酶的水平在两组标本之间没有明显差别, NADH 脱氢酶, NADPH 脱氢酶和半乳糖脱氢酶的活性在培养的破骨细胞中低于印片的破骨细胞。琥珀酸脱氢酶的活性在培养及印片的破骨细胞中均相似。

3 讨论

3.1 本文研究表明, 破骨细胞是一种非常活跃的细胞, 在体外培养时可产生溶酶体酶及大量的线粒体酶, 后者为厌氧脱氢酶, 包括琥珀酸脱氢酶、NADH 和 NADPH 脱氢酶, 然而这些酶的活性仍低于新鲜印片破骨细胞厌氧脱氢酶。众所周知, 厌氧脱氢酶是一种催化从底物清除氢离子并产生能量 (主要为 ATP) 供应细胞代谢的酶类。对于破骨细胞的功能很可能需要不同的厌氧脱氢酶参与。在培养的破骨细胞内这些厌氧脱氢酶的低活性也可表明培养的细胞呈低调节状态。破骨细胞性骨吸收取决于来自破骨细胞的酸性和溶酶体酶直接分泌入破骨细胞刷状缘和矿化骨表面之间的微环境^[9], 因此, 这可解释为什么培养的破骨细胞在它们短暂的生命里仍然具有骨吸收的能力。

3.2 组织印片标本破骨细胞的一些酶的特性目前存在争论。例如, Walker 等^[1,11]发现在印片鼠的破骨细胞里没有 NADP 和 NAD 脱氢酶的活性, 而 Addison^[12]和 Fullmer^[13]则发现这些酶存在于猫、鼠的破骨细胞里, 在猫的破骨细胞里没有 β -酸性半乳糖苷酶, 仅有较弱的 β -葡萄糖醛酸酶。目前认为, 骨基质的降解是多种溶酶体酶的酸离子参与的过程。TRACP, ACP 可以降解固体的钙磷矿化底物, 而 β -酸性半乳糖

苷酶和 β -葡萄糖醛酸酶则能够降解糖蛋白和蛋白多糖。体外培养的破骨细胞具有丰富的不同的溶酶体酶和厌氧脱氢酶,提示破骨细胞骨吸收是一个复杂的代谢过程,累及到大量蛋白酶和能量产生,并需要不断提供能量给胞浆用于酶的胞吐、胞吞活动。

综上所述,培养和新鲜组织印片的破骨细胞含有丰富的参与骨吸收的多种溶酶体酶和厌氧脱氢酶,培养破骨细胞多数脱氢酶的活性低于印片破骨细胞。

(本文图 a~h 见插图第 1 页)

参 考 文 献

- 1 Zheng MH, Nicholson G, Warton A. What is new in osteoclast ontogeny? (review). *Path Res Pract*, 1991; 187: 117-125.
- 2 Chambers TJ, Magnus CJ. Calcitonin alters behaviour of isolated osteoclasts. *J Pathol*, 1982; 136: 27.
- 3 Osdoby P, Martini MC, Caplan L. Isolated osteoclasts and their presumed progenitor cell, the monocyte, in culture. *J EXP Zool*, 1982; 224: 331.
- 4 Zamboni ZA, Teti A, Primavera MV. Isolated osteoclasts in primary culture: First observations on structure and survival in culture media. *Ana Embryol*, 1982; 165: 405.
- 5 Zheng MH, Papadimitriou JM, Nicholson GC. A quantitative cytochemical investigation of osteoclasts and multinucleate giant cells. *Histochem J*, 1991; 23: 180.
- 6 Hayashi M, Nakajima Y, Fishman WH. The cytochemical demonstration of β glucuronidase employing naphthol AS-BI glucuronide and hexazonium pararosanilin; preliminary report. *J Histochem Cytochem*, 1964; 12: 293.
- 7 Bancroft JD, and Stevens A. *Theory and practice of histological techniques*, 3rd ed Churchill-livingstone, Edinburgh, 1990, 379.
- 8 Bancroft JD, and Hand NM. *Enzyme histochemistry, microscopy handbooks* 14. Oxford University Press Royal Microscopical Society, 1987, 52-55.
- 9 Zheng MH, McCaughan HB, Papadimitriou JM, et al. Tartrate resistant acid phosphatases in rat cultured osteoclasts is inhibited by a carboxyl terminal peptide (osteostatin) from parathyroid hormone-related protein. *J Cell Biochem*, 1994; 54: 145.
- 10 Walker DG. Citric acid cycle in osteoclasts and osteoblasts. A histochemical study of normal and PTH treated rats. *Bull Johns Hos*, 1961; 108: 80.
- 11 Walker DG. Enzymatic and electron microscopic analysis of isolated osteoclasts. *Cal Tissue Res*, 1972; 9: 296.
- 12 Addison WC. Enzyme histochemical properties of kitten osteoclasts in bone imprint preparations. *Histochem J*, 1978; 10: 645.
- 13 Fullmer HM. Enzymes in mineralised tissues. *Clin Orthop*, 1966; 48: 285.

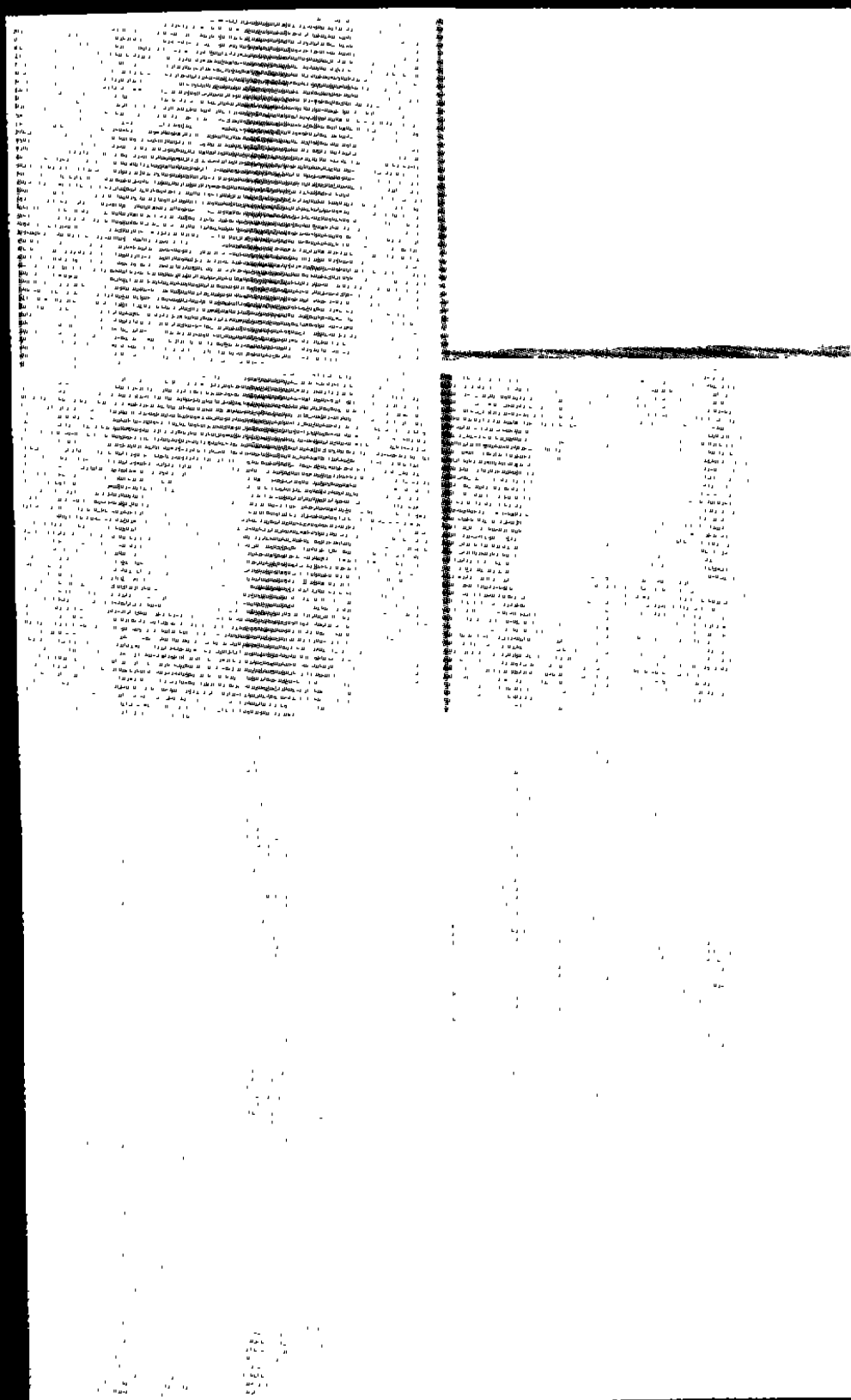


图 a、b、c 分别为 TRACP, ACP 和 β -葡萄糖醛酸酶染色。培养的破骨细胞 2-7 个细胞核, 阳性产物呈红色弥漫分布于整个胞浆, 刷状缘及胞核不着色 $\times 400$

图 d β -酸性半乳糖苷酶染色。阳性产物呈天蓝色沉积在胞浆中央, 刷状缘及胞核不着色 $\times 400$

图 e、f、g、h 分别为 NADH 脱氢酶, NADPH 脱氢酶, 乳酸脱氢酶和琥珀酸脱氢酶染色, 反应的阳性产物呈黑蓝色, 分布在胞浆, 胞核不着色 $\times 400$