

体外培养破骨细胞骨吸收功能的检测和应用

高建军 王洪复审

骨吸收是破骨细胞(OC)的主要功能,受内分泌激素和骨组织微环境的调控。如何检测OC的骨吸收功能一直是骨代谢研究的重要课题。随着OC分离培养技术的发展,体外检测OC骨吸收功能的指标不断完善。酶组织化学法、同位素示踪法和骨片上吸收陷窝形态计量分析法等成为常用方法应用于骨吸收的研究中,其中骨片上吸收陷窝形态计量分析法是OC骨吸收功能的直观指标,在OC功能研究和骨质疏松症防治药物疗效研究中,越来越得到广泛应用。本文就体外培养OC功能检测指标的进展与应用作一概述。

1 酶组织化学法

抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)是OC特征性酶,其表达和分泌与OC功能密切相关。既为OC重要的组化识别指标,也是其功能的反映。普遍采用的偶氮偶联组化分析技术,以奈酚二磷酸盐为底物,偶氮副品红为显色剂,可以检测出该酶的存在和活力^[1]。在骨吸收基础研究中,常用TRAP染色技术识别OC,如骨髓细胞培养中观察OC由单核细胞的产生及激素和细胞因子对OC发生的影响^[2,3],及衡量激素或生长因子对长骨分离OC生存力、活性的影响等^[4,5]。具体方法包括:TRAP阳性细胞计数或单细胞/培养液TRAP浓度定量比色测定。一些研究者以“甲基伞形内酯磷酸盐”为底物,利用其水解可以产生荧光物质的特点,与细胞上清液或裂解液反应后荧光比色测定分析TRAP的活性,观察细胞因子对OC功能的影响。

抗酒石酸酸性三磷酸腺苷酶(TrATPase)

是TRAP的同工酶,与质子泵功能有关,是OC酸化吸收环境,发挥有效吸收所必需^[1]。以ATP二钠盐为底物,硫化铵为显色剂,PbS为最终产物的镁激活铅染色方法,可以作为识别OC的组化指标。与TRAP比较特异性更高,也能间接了解TrATPase的活力。于明香等采用该方法观察了OC体外生成时间及CT的影响。由于技术要求比较高,更多的应用情况尚未见报道。

OC骨吸收时氧代谢明显活跃,大量产生氧自由基,NBT染色技术可以反应细胞自由基的量,而作为OC活化指标。其原理是以NBT为受氢体与氧自由基反应生成蓝色沉淀,溶解后比色测定,Oreffo^[6]等用该方法评价OC骨吸收状态及OIF和TGF- β 对其影响。由于干扰因素比较多,特异性比较差。该方法尚处于初步应用阶段。

酶组织化学法是以OC特征性酶化学反应为基础的检测方法。简便易行,在观察影响因素对OC的短期作用时,Oreffo认为其比骨吸收陷窝分析法更灵敏。然而尽管TRAP与骨吸收密切相关^[7],仍不能直接代表骨吸收情况,况且酶的非特异性存在^[8],使该方法必须结合其他检测手段,才能得到比较肯定的结果。

2 同位素示踪法

采用放射性同位素量化骨吸收已有30多年的历史。Raisz于1965年首先采用⁴⁵Ca预标记底物来评价单核细胞的骨吸收特性^[9]。以后用于淋巴细胞、吞噬细胞等骨吸收功能研究^[10]。80年代以来随OC培养技术的发展,逐渐成为OC骨吸收功能评价的常用方法。其原理是采用活体预标记放射性药物的骨组织为底物,与OC共培养,随着OC对骨组织溶解消化过程,放射性元素被释放到培养液中,根据释放

比(净释放量/掺入量)来衡量 OC 骨吸收能力。具体方法包括底物活体标记、共培养、取样测量等三个步骤。常用放射性药物为⁴⁵CaCl₂、H-脯氨酸^[1]。

(1) 底物标记分胎鼠标记和成年鼠标记二种。胎鼠标记,取孕 18 天大鼠皮下注射⁴⁵CaO₂ 2mCi 或³H-脯氨酸 1mCi,第二天解剖分离胎鼠四肢长骨,去除周围结缔组织,冻融复活,纵向剖开,暴露矿化软骨并剪成碎片,紫外线消毒,空气干燥后备用。成年鼠标记,取 80g 左右刚断奶大鼠,隔日皮下注射³H-脯氨酸 1mCi×10 天,或⁴⁵CaCl₂ 0.1mCi×14 天,停药后 2~3 天处死,分离四肢长骨后同上述处理并磨碎过网,取出 Φ20~40μm 骨碎片备用。

(2) 共孵育,取预标记骨组织(100μg)与分离或诱导的 OC 共培养,每日换液 10%,并设阴性对照。

(3) 取样测量,定时取培养液 5⁰l,液体闪烁计数测量得总释放量和非特异释放量。取骨组织消化处理(6NHCl 过液)后可测得⁴⁵Ca 总量,脱钙(120mmol EDTA 37℃过夜)、消化(200μg/ml 胰蛋白酶 37℃,40 分钟)等处理后可测量得胶原中³H 总量。计算净释放比(总释放量-非特异释放量)/总量,以净释放比值来反应骨吸收的程度,其中⁴⁵Ca 净释放比反映骨组织钙化矿盐吸收溶解程度,³H 净释放比反应骨组织中胶原吸收降解程度。

同位素示踪法是 OC 骨吸收为基础的检测方法,较准确量化 OC 的骨吸收功能,常用于骨髓细胞培养中产生 OC 样细胞的功能观察和吸收能力较强的鸡 OC 功能检测^[2]。为减少非吸收性放射性物质的影响,要求 OC 数量大,且具有放射性,限制该方法的使用。

3 骨片上吸收陷窝形态分析法

OC 有特异的溶骨能力,扫描电镜对原位和体外骨片上培养的 OC 观察均可发现 OC 在骨组织中能产生吸收陷窝。形成的陷窝数量、大小、深度与 OC 的功能有关^[3]。1984 年 Chambers^[73]和 Bodye^[14]等首先根据 OC 骨片上陷窝的数量和面积来反映 OC 的骨吸收功能。主要

方法是在薄切片上(100μm)接种分离的 OC,经 10~20 分钟贴附纯化后,常规培养 24 小时,超声清洗,戊二醛固定,脱水镀膜后扫描电镜(SEM)观察,依据“边界清晰、形状典型(圆形、椭圆或腊肠形)、底面粗糙不平,有纤维样基底”的形态特征(如图 1),对图像进行分析处理,以吸收面积/骨片面积或陷窝数/骨片来表示 OC 骨吸收的能力。近年来,在培养底物取材、细胞分离培养技术和观察手段上取得不少经验,使该评价方法不断得到完善(表 1)。



图 1 扫描电镜示破骨细胞骨吸收陷窝

表 1 体外培养破骨细胞骨吸收陷窝形态分析技术主要进展

主要技术环节	方 法
底物来源	人股骨皮质骨,牛股骨皮质骨、鲸牙、象牙
细胞来源	兔(新生兔、胎兔)、鼠(胎鼠、新生鼠)、鸡
培养基	MEM 199 培养基
培养时间	24 小时、6 天
观察手段	扫描电镜、倒置相差显微镜、偏振光显微镜、光学显微镜

培养底物选用牛股骨皮质骨,来源丰富,可

以获得比较好的吸收陷窝^[12]。而鲸或象的牙切片,由于减少了血管管腔和陈旧吸收的影响,使观察效果大大提高^[15]。鸡的 OC 的骨吸收能力是哺乳类动物的 5~6 倍,能在骨片上迅速(2~4 小时)形成数量较多的比较典型的吸收陷窝,更适用于该评价方法^[17]。

OC 在骨片上形成吸收陷窝,其陷窝的数量、大小和深度直接反映 OC 的骨吸收能力,陷窝的形态观察,计数和大小测量是检测的主要指标。扫描电镜是传统的观察手段,1000 $\times$ 下可以清晰地识别吸收陷窝,结合图像处理系统能够计量和测量陷窝的数量和面积。但在低倍下(<400 $\times$)的观察识别仍受 Howship 氏管腔的影响,所获得的信息也有限。近年随着更先进的显微镜应用于 OC 功能的研究中,提高了陷窝计数和测量的准确性、可靠性。如扫描探针显微镜、立体扫描电镜能方便地获取陷窝的三维信息,使 OC 吸收功能的研究更精确化。

电镜观察准确可靠,但所需设备昂贵,标本制作复杂,周期较长,寻求一种简便易行的方法已势在必行。1984 年 Bodye 等根据甲苯胺蓝可以使胶原异染的特性,应用于观察,发现 OC 形成的陷窝可以通过甲苯胺蓝染色在光镜下观察。Arnett 采用该方法,取培养 24 小时的骨片,经超声处理,固定、系列酒精脱水后染色(1%甲苯胺蓝 $\times$ 4 分钟),光学显微镜下观察,分析了鼠 OC 和鸡 OC 在牛股骨切片上所形成的陷窝,与 SEM 比较认为该方法可以作为禽类 OC 功能评价的观察手段^[17]。由于大鼠分离的 OC 数量较少,骨吸收功能不强,在骨片上形成陷窝较少较浅,影响观察识别,尚不能作为一个理想手段。

此后 Sato 在超声去除细胞后不经过染色,用反射式偏光显微镜($\lambda/4=45^\circ$)成功地观察了新生大鼠 OC 在牛皮质骨切片上所形成的吸收陷窝,其识别能力优于甲苯胺蓝光镜下观察,在排除非吸收性陷窝方面更优于同倍下 SEM^[18]。在 500 $\times$ 可以清晰识别陷窝,结合图像分析可以进行面积和深度测量及功能评价。

骨陷窝是 OC 骨吸收的直接结果。经过研

究者^[13,14,18,19]不断改进使该方法——陷窝分析技术成为骨吸收基础研究中普遍接受的快速、可靠的 OC 功能检测方法,适用于诱生 OC 和直接分离 OC 的功能检测及影响因素的作用观察,尤其在 Fenton 等将体外 OC 培养时间延长到 144 小时,甚至 240 小时后,为研究 OC 成熟和活化提供了基础。结合成骨细胞(OB)共培养技术等,使其对研究细胞因子,OB 与 OC 的相互关系及药物的作用机制等具有独特优势。

总之,对 OC 功能的检测是研究 OC 骨吸收机制的手段,也是骨质疏松防治药物筛选的基础。近年来,这方面工作取得很大成绩,但仍存在许多不足,尤其我国起步较晚,更待进一步完善和发展。

参 考 文 献

- 1 Andersson GN, Marks SC. Tartrate-resistant acid AT-Pase as a cytochemical marker for osteoclasts. *J. Histochem Cytochem* 1989;37:115
- 2 Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, et al. Macrophage colony stimulating factor is indispensable for proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J. Clin Invest* 1993;91:257
- 3 Perkins SL, Kling S. Local concentrations of macrophage colony stimulating factor mediate osteoclastic differentiation. *Am J Physiol* 1995;269:E1024
- 4 Fenton AJ, Martin TJ, Nicholson GC. Long-term culture of disaggregated rat osteoclasts: Inhibition of bone resorption and reduction of osteoclast-like cell number by calcitonin and PTHrP(107-139). *J Cell Physiol* 1993;155:1
- 5 于明香,金慰芳,王洪夏.破骨细胞体外培养与标志酶染色,全国代谢性骨病学术研讨会(论文汇编),1996,pp 59-60
- 6 Oreffo ROC, Bonewald L, Kukita A, et al. Inhibitory effects of the bone derived growth factors osteoinductive factor and transforming growth factor- α on isolated osteoclasts. *Endocrinology* 1990;126:3069
- 7 Zaidi M, Moonga B, Moss DW, et al. Inhibition of osteoclastic acid phosphatase abolishes bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;159:68
- 8 Modderman WE, Tuinenburg-Bol AC, RAAP, Nijweide PJ. Tartrate resistant acid phosphatase is not an exclusive marker for mouse osteoclasts in cell culture. *Bone* 1991;12:81
- 9 Raisz LG. Bone resorption in tissue culture, factors influencing the response to parathyroid hormone. *J Clin Invest* 1965;44:103
- 10 Teitelbaum SL, Stewart CC, Kahn AJ. Rodent peri-

- toneal macrophages as bone resorbing cells. *Calcif. Tissue Int* 1979;27:255
- 11 Blair HC., Kahn AJ., Crouch EC. et al. Isolated osteoclasts resorb the organic and inorganic components of bone. *J Cell Bio* 1986;103:1164
 - 12 Jones SJ., Boyde A. Some morphological observation on osteoclasts. *Cell Tiss Res* 1977;185:387
 - 13 Chambers TJ., Revell PA., Fuller K. et al. Resorption of bone by isolated rabbit osteoclasts. *J Cell Sci* 1981;60:383
 - 14 Boyde A., Alt NN., Jones SJ. Resorption of dentine by isolated osteoclasts in vitro. *Br Dent J* 1984;156:216
 - 15 McSheehy PMJ., Chambers TJ. Osteoblast-like cells in the presence of the parathyroid hormone release soluble factor that stimulate osteoclastic bone resorption. *Endocrinology* 1986;119:1654
 - 16 Sahn M., Goenther HL., Fleisch H. et al. Bisphosphonates act on rat bone resorption through the mediation of osteoblasts. *J Clin Invest* 1993;91:2004
 - 17 Arnett TR., Dempster DW. A comparative study of disaggregated chick and rat osteoclasts in vitro: effects of calcitonin and prostaglandins. *Endocrinology* 1987;120:602
 - 18 Sato M., Grosser W. Effects of bisphosphonates on isolated rats osteoclasts as examined by reflected light microscopy. *J bone Miner Res* 1990;5:
 - 19 Tamura T., Takahashi N., Akatsu T. et al. New resorption assay with mouse osteoclast-like multinucleated cells formed in vitro. *J Bone Miner Res* 1993;8:953

• 短篇报道 •

道路颠簸致高龄乘客脊柱骨折 2 例原因分析

赵 森 何恩晋 李德耀 纪宪朝

由于道路颠簸致高龄乘客脊柱骨折为少见。1995年3月8日我院收治2例,系同车高龄患者,约行3公里颠簸路段后出现腰脊部痛而发现。现报告如下。

例1 女,74岁,农民,查体:脊柱生理弯曲存在,未见明显畸形及肿胀,胸1棘突部局限性固定性压痛及叩击痛,活动轻度受限。X线片示胸1椎体楔变,密度增高,轮廓不清,可见骨纹理中断,片内椎体骨质密度均明显降低。诊断:胸1椎体压缩性骨折(I度),严重骨质疏松症(Sight分类法I级)。

例2 女75岁,农民,查体:脊柱生理弯曲存在,未见明显畸形及肿胀,胸12—腰1棘突部局限性固定性压痛及叩击痛,活动轻度受限。X线片示腰1椎体楔变,密度增高,轮廓不清,未见明显骨折线,但可见骨纹理中断,片内椎体骨质密度均降低明显。诊断:腰1椎体压缩性骨折(I度),严重骨质疏松症(Singht分类法I

级)。

讨论:(1)严重骨质疏松症可能是高龄患者骨折发生的主要因素。本组2例均为严重骨质疏松症。据文献报道自50岁后人体骨量逐渐下降,即通过骨的吸收增加细胞外液的钙含量,以维持体内生理需要。从而使骨质密度降低,加之高龄患者椎间盘的退化不能有效缓冲暴力的传递而致脊柱骨折。(2)坐于行进在颠簸道路上的车上,使前后向、上下向作用力作用于胸腰段脊柱可能是引起高龄乘客脊柱骨折的外因。胸腰段为较稳定的胸、腰段脊柱交界处,且动度大,加之胸段脊柱生理性后突,腰段脊柱生理前突,使上下向,前后向的暴力在胸腰段集中,反复多次的短期内积累劳损,导致严重骨质疏松的脊柱骨折。