

# 体外培养破骨细胞的功能观察

于明香 金慰芳 王洪复

**摘要** 观察破骨细胞在离体状态下的骨吸收功能。新鲜牛皮质骨经锯齿式切片机横切成 $50\mu\text{m}$ 厚 $0.5\times 0.5\text{cm}$ 大小骨片。参照已建立的破骨细胞分离培养方法,从新生 Wistar 大鼠四肢长骨分离破骨细胞,培养于 $\Phi 2.5\text{cm}$ 细胞培养皿内或上述骨片上,相差倒置显微镜或扫描电镜观察,可见培养的细胞具有典型破骨细胞的形态特点,接种于骨片上的破骨细胞分别培养1、3、5、7天,扫描电镜观察,可见破骨细胞能在骨片表面形成吸收陷窝,其形态多样,深浅不一,边界清晰,底面粗糙,而且随培养时间延长,陷窝扩大,数量增多。结论,破骨细胞在体外培养条件下具有良好的骨吸收功能,可进行药物干预的研究。

**关键词** 破骨细胞;体外培养;骨吸收

## Function of osteoclasts cultured in vitro

Yu Mingxiang Jin Weifang and Wang Hongfu

(Shanghai Medical University, 200032, Shanghai)

**Abstract** We observed the bone-resorptive function of osteoclasts in vitro. Fresh cow cortical bones were cut across into slices  $50\mu\text{m}$  in thickness and  $0.5\times 0.5\text{cm}$  in area with saw-like microtome. According to the method established previously, the osteoclasts were disaggregated from the neonatal Wistar rat long bones and settled onto  $\Phi 2.5\text{cm}$  culture dishes or the cut bone slices. Under phase-contrast-inverted microscope or scanning electron microscope, it was found that the cultured cells had typically morphological characteristics of osteoclasts. The osteoclasts settled onto bone slices were cultured for 1, 3, 5 and 7 days, separately. Scanning electron microscopy showed that the osteoclasts could produce excavation on the bone surface which were of complex morphology, different depth, a well-defined outline and distinctive fibrillar base. Furthermore, with the prolonged culture, the area of the excavation enlarged and its number increased. It is concluded that the osteoclasts have good bone-resorptive function on the condition of culture in vitro and can be used to study the efficacy of drug intervention.

**Key words** Osteoclasts Culture in vitro Bone resorption

破骨细胞(Osteoclasts, OC)的主要功能为骨吸收,骨吸收亢进可导致骨质疏松。近年来随着破骨细胞体外培养方法的建立,使离体研究破骨细胞骨吸收功能与干预药物成为可能。我们根据 Fenton 方法加以改良建立了大鼠破骨细胞体外培养方法<sup>[1]</sup>,并进一步应用灭活牛骨片观察了破骨细胞的骨吸收功能。

## 1 材料与方法

**1.1 动物** 出生24小时内的 Wistar 大鼠,上

海医科大学放射医学研究所实验动物房提供,沪医实验动物准字:34。

**1.2 主要试剂** MEM 粉剂与胎牛血清(GIBCO BRL, U. S. A), HEPES(中国科学院上海生物化学研究所), 25%戊二醛(E. Merck, Germany), 临用时以 $0.1\text{mol/L}$  PBS 稀释10倍。

**1.3 主要仪器**  $\Phi 2.5\text{cm}$  细胞培养皿(Costar, U. S. A), 24孔细胞培养板(Nunclon, Denmark), 二氧化碳培养箱(Heraeus, Germany), 锯齿式切片机(Leitz 1600, Germany), 扫描电镜(日立 S-520, Japan)。

**1.4 薄骨片的制备** 取新鲜牛股骨的皮质骨,

作者单位:200032,上海医科大学放射医学研究所, 271000,现在泰山医学院工作(于明香)

-30℃贮存。临用时经锯式切片机横切成50μm厚0.5×0.5cm大小骨片,置蒸馏水内,超声清洗10分钟×3次,再浸泡于抗菌素(青霉素1000u/ml,链霉素1000μg/ml)内30分钟、3次。

**1.5 破骨细胞分离与培养** 参照已建立的破骨细胞分离培养方法<sup>[1]</sup>,拉颈处死新生大鼠,75%酒精浸泡后,分离股骨、肱骨和胫骨,清除附着于骨表面的软组织与骨髓,骨干部分用MEM培养液洗两次后,将骨质轻轻刮入培养液(MEM,25mmol/L HEPES,15%胎牛血清,100u/ml青霉素,100μg/ml链霉素,pH7.2)内,再用圆头吸管反复吹打骨质碎片2分钟,静置30秒钟,将上层细胞悬液吸入Φ2.5cm细胞培养皿(2ml/孔)或放置骨片的24孔细胞培养板(1ml/孔)内,置二氧化碳培养箱,在95%空气,5%二氧化碳,37℃条件下培养30分钟,用MEM冲掉未贴壁细胞,更换培养液,继续培养,以备活体观察与扫描电镜观察。

#### 1.6 观察指标

**活体观察** 应用相差倒置显微镜观察培养于Φ2.5cm细胞培养皿内的破骨细胞形态与运动情况,培养成功方可进行电镜观察。

**扫描电镜观察** 破骨细胞形态观察,将骨片上的细胞培养24小时,以2.5%戊二醛固定。破骨细胞骨吸收功能观察,将骨片上的细胞分别培养1、3、5、7天,然后置0.25mol/L氢氧化铵内超声处理10分钟,以除去骨片上生长的细胞,再以2.5%戊二醛固定。每实验组还另设一张未接种破骨细胞悬液,但其他条件完全一致的骨片。上述骨片再经1%锇酸后固定,酒精系列脱水,醋酸异戊酯置换酒精,二氧化碳临界点干燥,镀金,日立S-520扫描电镜(加速电压15KV)观察骨片上破骨细胞的表面形态与破骨细胞在骨片上形成的骨吸收陷窝形态。

## 2 结果

**2.1 相差倒置显微镜观察** 培养30分钟,破骨细胞即贴壁,胞浆开始伸展,2小时后细胞形态清晰,呈油煎蛋形、长条形、漏斗形或不规则形,有片状或丝状伪足,细胞内可见几个到十几个细胞核,胞浆内有时可见大小不等的空泡(图1)。



图1 活体观察 分离培养的大鼠(OC)呈油煎蛋形,含16个细胞核,胞浆内可见小的空泡,细胞周边有丝状伪足 ×1000

#### 2.2 扫描电镜观察

**破骨细胞形态** 扫描电镜观察可见破骨细胞的形态多样,与相差倒置显微镜所见一致,细胞表面有大量片状或丝状伪足样突起(图2)。



图2 扫描电镜观察 OC生长于骨片上,表面有片状伪足样突起,右侧有一骨吸收陷窝 ×1500

**骨吸收陷窝** 培养在骨片上的破骨细胞24小时即形成少量小陷窝,随着培养时间延长,陷窝扩大、数量增多,有时成串出现。陷窝形态多样,如圆形、椭圆形、腊肠形、复合形或不规则形,陷窝的深浅也不一致,有些陷窝较深,边界清晰,底面粗糙,纤维样基底明显,与骨片本身的血管通道及骨细胞陷凹明显区分,有些则较浅,仅有斑点状骨质吸收区或骨片表面变粗糙区,这种变化在未接种破骨细胞的骨片上未曾见到(图3)。



图3 扫描电镜观察 OC 侵蚀骨片形成椭圆形骨吸收陷窝,边界清晰,底面粗糙,有纤维样基底,上半部有骨质未吸收区 · 1500

### 3 讨论

早在1873年 Kolliker 首先报道了破骨细胞之后,人们便认识到破骨细胞与骨吸收有关,并对其骨吸收机理进行了研究。但是直到1982年 Chambers<sup>[2]</sup>等首先在体外培养出破骨细胞后方便离体研究破骨细胞的形态与功能成为可能。

破骨细胞系来源于单核—巨噬细胞前体细胞,具有极强的溶骨能力,通过扫描电镜观察体外培养破骨细胞在骨片上形成吸收陷窝的能力是判定破骨细胞骨吸收功能的重要依据<sup>[3]</sup>。将破骨细胞接种于灭活牛骨片、象牙片或人股骨片上,一般培养24小时即可形成少量陷窝,随着培养时间延长,陷窝扩大,数量增多,陷窝形态多样,深浅也不一致,而且不同物种的破骨细胞形成陷窝的能力也不相同,鸟类破骨细胞形成陷窝的能力比哺乳类破骨细胞强5~6倍<sup>[4,5]</sup>。破骨细胞骨吸收功能与陷窝数量及陷窝面积明显相关,因此可通过计数陷窝数量或计算陷窝面积来评价破骨细胞的骨吸收功能,并进行药物干预的研究<sup>[6]</sup>。

本文所培养的破骨细胞具有典型破骨细胞的形态特点,而且在骨片上形成了典型的骨吸收陷窝,这种陷窝在未加破骨细胞的骨片上未曾见到,而且这种陷窝与骨片本身的骨细胞陷凹及血管通道也完全不同。因而可作为计数陷窝数量和计算陷窝面积来估计破骨细胞功能与筛选骨吸收抑制药物的依据,本实验室正在这一方面作进一步研究。

### 参 考 文 献

- 1 丁明香,金懋芳,王洪复.破骨细胞体外培养生存数的观察与鳗鱼降钙素的影响.中国骨质疏松杂志1996;2(4):13
- 2 Chambers TJ & Magnus CJ. Calcitonin alters behaviour of isolated osteoclasts. J Pathol 1982;136:27
- 3 Kanehisa J & Heersche JNM. Osteoclastic bone resorption: in vitro analysis of the rate of resorption and migration of individual osteoclasts. Bone 1988;9:73
- 4 Fenton AJ, Martin TJ, Nicholson GC. Long-term culture of disaggregated rat osteoclasts: inhibition of bone resorption and reduction of osteoclastlike cell number by calcitonin and PTHrP[107-139]. J Cell Physiol 1993;155:1
- 5 Arnett TR & Dempster DW. A comparative study of disaggregated chick and rat osteoclasts in vitro: effects of calcitonin and prostaglandins. Endocrinology 1987;120(2):602
- 6 Moonga BS, Towhidul Alam ASM, Bevis PJR, et al. Zinc is a potent inhibitor of osteoclastic bone resorption in vitro. J Bone Miner Res 1995;10(3):453