

· 药物研究 ·

骨质疏松症防治药物的体外细胞药效评价

王洪复 金慰芳 高建军

骨质疏松症已成为人类老年时生活质量下降和寿命缩短的主要原因之一,因而对有效防治骨质疏松症的药物研究是近四分之一世纪以来十分重视的课题。随着细胞实验技术和分子生物学技术的发展,骨质疏松症防治药物的研究在细胞与分子水平阐明了骨质疏松症病理机制的基础上,又取得了长足的进展。骨质疏松症的发生与成骨细胞和破骨细胞的功能失偶联有关,因而在细胞水平上观察药物对骨细胞功能的调整作用是评价骨质疏松症防治药物药效的方法之一。本文分别就成骨细胞药效和破骨细胞药效评价方法作一抛砖引玉的介绍,以供骨质疏松症防治药物研究的参考。

1 骨形成促进药物的体外细胞药效评价

成骨细胞是骨形成细胞,可合成、分泌 20 余种胶原与非胶原蛋白和一些骨代谢局部调节因子,在骨重建中生成类骨质和促进类骨质矿化,形成的新骨质修补破骨细胞骨吸收形成的陷窝。成骨细胞功能减退致新骨形成量减少,对骨吸收陷窝的修补能力减弱,造成骨小梁变细、薄弱、穿孔,皮质骨出现多孔性改变。因此,成骨细胞骨形成促进药物是防治骨质疏松症的主要途径之一。为此,必需建立成骨细胞体外培养技术和骨形成功能检测指标。

1.1 成骨细胞体外培养技术

1)取材 以新生(24 小时或 1~3 天)大、小鼠或 19~21 天妊娠胎鼠的头盖骨为材料,分离培养的细胞系为有分化潜能的前成骨细胞,

其具有增殖分化的能力,是观察增殖能力和功能表达的理想材料。

2)细胞收集 取材于头盖骨培养成骨细胞应用酶消化法,酶消化能去除细胞间质,使细胞松散分离。标本先经 0.25% 胰蛋白酶预消化 15~20 分钟,以清除掉纤维组织细胞。然后以 0.1% II 型胶原酶,在 37℃ 环境中振荡(50 次左右/分)消化 60 分钟,以 1000rpm 离心收集细胞。可再重复胶原酶消化 60 分钟,以收集尽可能多的细胞。胰蛋白酶预消化分离的细胞,90% 为成纤维细胞,以后由胶原酶消化分离的细胞,95% 为成骨细胞和骨细胞。

3)细胞培养 将分离收集的细胞以 $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ 的密度接种于培养瓶中,置 5% CO_2 、37℃ 培养箱培养。24 小时可见细胞贴壁生长,胞浆开始伸展,换新鲜培养液,以后隔 48 小时替换培养液。于接种后第 4 天作第二继代培养,先以 0.25% 胰蛋白酶使贴壁细胞消化松解、变圆,3~5 分钟吸出消化液,加入新鲜培养液,轻摇,细胞即脱壁。以 $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ 的密度移入含培养液的新培养瓶继续培养。培养液是维持细胞生存和生长所需的基本营养溶液,常用 MEM(minimum Eagle medium)、10% 小牛血清或胎牛血清、青霉素、链霉素组成,用时新鲜配制,冷冻保存。

1.2 成骨细胞鉴定 为确认所培养的细胞为成骨细胞,须以一定的特异性指标对培养细胞进行鉴定。主要指标为:

1)形态观察 在倒置相差显微镜下观察,成骨细胞呈三角形、多角形和纺锤形,胞浆丰富的向外伸展,伸出几个突起与邻近的细胞伸出的突起相联。胞核大而清晰,呈圆形或卵圆形,

含1~2个核仁(照片1)。



照片1 活体观察,OB呈不规则多角形,单个卵圆形核 ×100

2)ALP染色反应 成骨细胞含丰富的碱性磷酸酶(ALP),是成骨细胞的特异标志酶。于培养6天,应用改良的 Gomori 氏钙钴法作细胞化学染色,成骨细胞胞浆可见棕褐色阳性颗粒(照片2)。



照片2 ALP染色,OB胞浆显黑色阳性颗粒 ×100

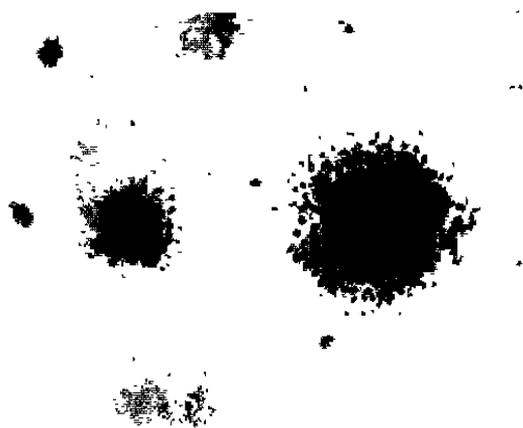
3)PAS染色反应 成骨细胞胞浆含丰富的基质前体成分,应用过碘酸-Shiff 氏法细胞化学染色,呈红色阳性反应(照片3)。

4)矿化结节形成 培养10~14天的成骨细胞具有形成矿化结节的能力,是成骨细胞的重要标志。加入β磷酸甘油可诱导成骨细胞分泌碱性磷酸酶,促进有机磷分解为磷酸盐,使钙盐沉积,形成矿化结节。应用0.1%茜素红细胞化学染色法呈现红色反应(照片4)。

1.3 成骨细胞药效评价指标



照片3 PAS染色,OB胞浆显红色阳性颗粒 ×100



照片4 ARS染色,矿化结节显红色反应 ×40

1)增殖率测定 MTT[3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]法测定成骨细胞存活和增殖具有简便、迅速、准确、安全等优点。MTT是一种淡黄色唑氮盐,是线粒体脱氢酶的作用底物,经活细胞作用后还原为不溶于水的蓝紫色甲臞(formazan)结晶,溶解后在560~610nm有一个较宽的最大吸收峰,用分光光度仪可测定其含量。A值大小与活细胞数之间有良好的线形关系。本实验室测定条件为:(1)测定时换成无血清培养液;(2)测定波长570nm;(3)37C、5%CO₂, MTT 孵育4小时;(4)MTT 50μl(5g/L),检测细胞数1×10⁶,线形r=0.9701。

2)ALP活性测定 成骨细胞含碱性磷酸酶是纤维母细胞的5~20倍,功能活跃时活性增高。以对硝基酚磷酸盐(PNPP)作底物,在

pH10.5、37℃条件下,ALP使PNPP转化为黄色的对硝基酚(PNP),应用分光光度计405nm波长测定吸收值(U/L)。用考马氏亮蓝法测定蛋白浓度(mg/L)。ALP比活性以U/mg蛋白表示。

3)矿化结节计数 经 β 磷酸甘油诱导形成的矿化结节,经95%酒精固定,0.1%茜素红液染色。以橘红色结节、边界清晰、 $>200\mu\text{m}$ 为标准,在40倍光镜下作结节计数。矿化结节形成代表了成骨细胞分化成熟,行使成骨功能的阶段,是成骨功能的形态表现。

4)骨钙素测定 骨钙素(BGP)是成骨细胞合成和分泌的特异产物,为成骨细胞分化成熟的指标,反映成骨细胞的成骨功能。可应用骨钙素放免分析方法测定细胞培养液中的骨钙素含量,以测定完整骨钙素分子较为准确。在以动物成骨细胞为对象而检测骨钙素时,应采用动物(如大鼠)骨钙素放免试剂盒。也可应用RT-PCR(逆转录-聚合酶链式反应)技术测定骨钙素的表达水平,每瓶接种100万细胞,培养第2天加入诱导液,培养14天终止,提取总RNA。进行逆转录反应、聚合酶链式反应和电泳分析。以骨钙素/肌动蛋白表示骨钙素表达量。

此外,有条件时还可应用RT-PCR技术测定培养成骨细胞的I型胶原、IGF-1等的基因表达水平,代表了成骨细胞的合成胶原和非胶原蛋白质的功能。

2 骨吸收抑制药物的体外细胞药效评价

破骨细胞的主要生物学功能是骨吸收,在骨重建中起启动和调控骨形成作用。破骨细胞骨吸收功能过度活跃可造成骨量过多丢失,是绝经后骨质疏松症等高转换型代谢性骨病的主要原因,因而对破骨细胞骨吸收功能的一定抑制是骨质疏松症防治药物的主要药理之一。为此,需建立破骨细胞体外培养技术和骨吸收功能的定量检测指标。

2.1 破骨细胞体外培养技术

1)取材 一般以出生24小时的大、小鼠或

出生10天的兔四肢长骨为材料,也可用鸡的长骨。近年来发展了由骨髓、脾组织诱导培养技术。

2)细胞收集 将附着于骨的软组织和干骺端清除后的长骨,在培养液内纵行剖开骨干,用手术刀轻柔地将骨质刮入培养液中,吸管吹打骨质碎粒使细胞分离,取上层细胞悬液培养。也可加入0.25%胰蛋白酶-EDTA或含胶原酶的 α -MEM液消化分离细胞。

3)细胞培养 将上层细胞悬液均匀接种于24孔或6孔培养板内,每培养孔中含薄骨片或盖玻片,加入培养液至1毫升(24孔)或2毫升(6孔)。置5%CO₂、95%空气、37℃培养箱中培养,培养30分钟,用MEM培养液冲掉未贴壁细胞,更换培养液,继续培养。每24小时更新一次培养液。MEM培养液含10%小牛血清、5%胎牛血清、100 μ /ml青霉素、100 μ g/ml链霉素,pH7.0~7.1。

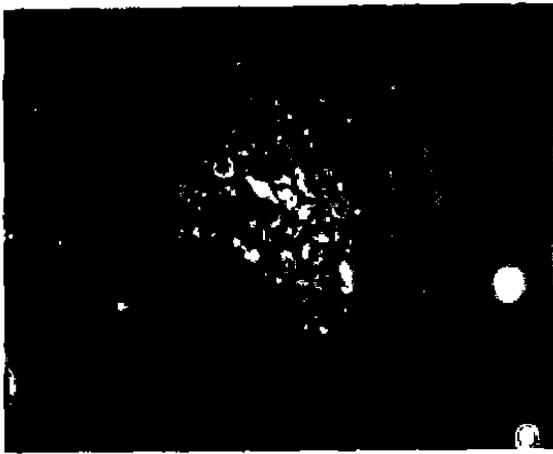
由于骨质中破骨细胞数量少(每 μm^3 组织中仅有2~3个),体积大、脆性高易受损伤,对环境物理、化学因素的影响很敏感,因而体外培养的难度较高,成功率低。分离培养中需注意动作要轻柔、速度要快、培养液pH要恒定。

2.2 破骨细胞鉴定 依据形态观察和生物学功能测定对破骨细胞进行鉴定,主要指标为:

1)形态学观察 破骨细胞是一类多核、体积大的巨细胞,在相差倒置显微镜下观察容易识别。细胞直径达30~100 μm ,含几个至数十个核。培养2小时后胞浆伸展,形态清晰,呈油煎蛋形、长条形、漏斗形、不规则形等(照片5)。

2)TRAP染色反应 抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)为破骨细胞的特异性标志酶,应用偶氮偶联组化分析法酶活性部位显示红色反应。以萘酚二磷酸盐为底物,偶氮副品红为显色剂,TRAP在酒石酸钾钠存在条件下将萘酚AS-BI磷酸盐水解为萘酚AS-BI,与显色剂结合形成红色沉淀(照片6)。

3)TrATPase染色反应 抗酒石酸酸性三磷酸腺苷酶(TrATPase)与破骨细胞质子泵功



照片5 活体观察,OC呈油煎蛋形,含16个细胞核,周边有丝状伪足。 ×1000



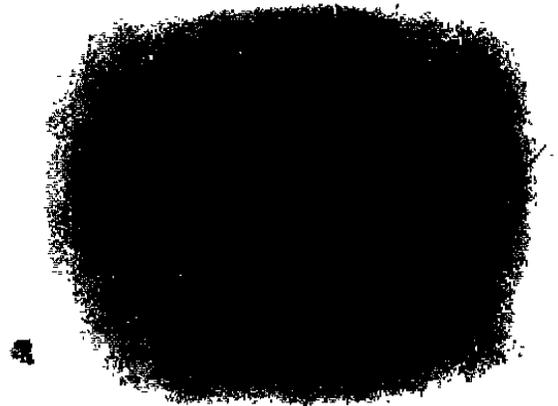
照片6 TRAP染色,OC呈不规则长条形,胞浆显红色反应。 ×1000

能有关,是破骨细胞骨吸收微环境酸化,发挥骨吸收所必需的酶。应用镁激活铅染色法,以ATP二钠盐为底物,硫化铵为显色剂,形成PbS棕黑色颗粒阳性反应,分布在胞浆中(照片7)。



照片7 TrATPase染色,OC呈不规则形,胞浆显棕黑颗粒。 ×1000

4)降钙素受体测定 破骨细胞及其前体含有丰富的降钙素受体,结合位点 $>10^6$ /细胞。降钙素受体只在定向破骨细胞前体及成熟破骨细胞中表达,因而是反映破骨细胞分化的特异性标志,并是与巨噬细胞多核体的鉴别指标。应用免疫细胞化学染色法,经ABC试剂反应和显色反应,呈橙黄色阳性反应,苏木精复染后核呈淡蓝色(照片8)。



照片8 降钙素受体免疫组化染色(ABC法),胞浆显棕色颗粒阳性反应 ×800

5)骨片吸收陷窝观察 骨吸收陷窝形成是破骨细胞的特异性功能标志,应用薄骨片(10~50 μ m薄)培养破骨细胞,经3天培养,有活性的破骨细胞在骨片上形成明显的吸收陷窝,基底粗糙不平,边界清晰,呈圆形或不规则形(照片9)。

2.3 破骨细胞药效评价指标

1)TRAP阳性多核破骨细胞计数 TRAP染色阳性细胞包括单核前破骨细胞和多核(≥ 2 个核)破骨细胞。将细胞悬液培养于含骨片24孔培养板中,加入药物分别于0时、培养3天取骨片,经2.5%戊二醛、4℃固定10分钟,蒸馏水清洗后,浸入TRAP孵育液37℃孵育50分钟,蒸馏水冲洗后1%甲苯胺蓝复染,光镜计数多核TRAP(+)细胞。培养3天时的多核破骨细胞生存数与0时(对照)比较,计算药物对破骨细胞生存的抑制率。

2)骨片吸收陷窝计数 将细胞悬液培养于含薄骨片24孔培养板中,每24小时取骨片经2.5%戊二醛4℃固定7分钟,超声清洗后,系



照片9 扫描电镜观察,吸收陷窝成串形成 ×1500

列酒精脱水,自然晾干,以1%甲苯胺蓝室温染色3~4分钟,蒸馏水冲洗后光镜计数吸收陷窝或进行形态计量,药物组与对照组比较计算药物对破骨细胞骨吸收陷窝形成的抑制率。

3)破骨细胞凋亡率分析 促进破骨细胞凋

亡是骨转换抑制药物的机制之一,因而测定破骨细胞凋亡率可作为破骨细胞药效评价的指标。检测细胞凋亡的方法较多,如细胞膜成分改变、DNA降解、流式细胞技术、DNA末端标记、内切核酸酶活力测定等。本实验室应用荧光染色方法观察培养破骨细胞的形态,可作为动态观察细胞药效评价的实用方法之一。在置有盖玻片的24孔培养板中,注入由长骨分离的细胞悬液培养,经4小时,待破骨细胞贴壁生长完全伸展时,加入一定浓度药物继续培养,于不同时间取出玻片,PBS清洗,进行固定和荧光染色,在荧光显微镜下观察。凋亡破骨细胞呈橙红色,可见体积缩小、核固缩、核边缘化、形成小体等改变(照片10)。



照片10 荧光显示显微镜观察,OC核固缩,凋亡小体形成 ×1200

(上接第45页)

庭和社会带来沉重的负担。因此,找一种方便有效的治疗方法,对改善老年妇女的健康水平,提高其生活质量,减轻其家庭和 社会的负担具有重要意义。笔者认为,本文所用中西医结合方法治疗绝经后妇女原发性骨质疏松症,具有用药简便,疗效较好,副作用少等优点,有一定实用价值。

参 考 文 献

- 1 刘成林. 营养与骨质疏松. 见:刘忠厚,主编. 骨质疏松研究与防治. 北京,化学工业出版社,1994. 154-158.
- 2 刘忠厚主编. 骨质疏松研究与防治. 北京,化学工业出版社,1994. 226,261.
- 3 丁桂芝,刘忠厚,周勇. 中西医结合防治骨质疏松症的基础与临床研究进展. 中国骨质疏松杂志,1997,3(2):82-83.
- 4 萼桂英,侯静. 去势骨质疏松动物血清 TRAP 及 BALP 水平的观察. 中国骨质疏松杂志,1997,3(4):38-41.