

体外培养破骨细胞的标志酶染色

于明香 金慰芳 王洪复

破骨细胞体外培养是从细胞与分子水平研究骨吸收机理与骨质疏松症防治药物的基础^[1]。由于破骨细胞数量少,很难分离到纯的破骨细胞,体外培养所获破骨细胞常与其他细胞混合存在,因此从这些混杂细胞内辨别出破骨细胞尤为重要。鉴别破骨细胞的方法有多种,其中最方便而具特异性的指标为标志酶 TRAP 与 TrATPase 染色,作者应用细胞化学方法成功地对外体培养破骨细胞的标志酶进行了染色,报道如下。

1 材料和方法

1.1 动物 出生24小时内的 Wistar 大鼠,本所实验动物房提供,沪医实验动物准字:34。

1.2 试剂 MEM 粉剂与胎牛血清(GIBCO BRL, U. S. A), ATP 二钠盐(中科院上海生物化学研究所), 萘酚 AS-BI 磷酸酯(Koch-Light Ltd, England), 副品红(上海新中化学厂)。

1.3 破骨细胞分离与培养 参考已建立的方法^[2], 拉颈处死新生大鼠, 75%酒精浸泡, 分离四肢长骨, 骨干部分用 MEM 培养液冲洗后放入玻璃培养皿(含 MEM、15%胎牛血清, pH7.2)内, 用解剖刀将骨质轻轻刮入培养液内, 静置30秒钟, 将细胞悬液吸入放置盖玻片或骨片的6孔细胞培养板内, 置二氧化碳培养箱培养30分钟, 用 MEM 培养液冲掉未贴壁细胞, 更换培养液继续培养以备活体观察与标志酶染色。

1.4 活体观察 应用相差倒置显微镜观察培养细胞的形态与运动情况, 并摄影记录。培养成

功方进行标志酶染色。

1.5 TRAP 染色 孵育液 A 液, 0.1 mol/L 醋酸缓冲液; B 液, 六偶氮副品红; C 液, 取萘酚 AS-BI 磷酸酯加入 N,N-二甲基甲酰胺溶解。将 A、B、C 三液按比例混匀, 调 pH 至 5.0, 加入酒石酸钾钠配成 TRAP 孵育液(对照组孵育液不含萘酚 AS-BI 磷酸酯)。玻片或骨片上的破骨细胞培养 6~144 小时后经 2.5% 戊二醛 4℃ 固定后放入孵育液内, 37℃ 孵育 50 分钟, 1% 甲苯胺蓝复染, 甘油明胶封片, 光镜观察。

1.6 TrATPase 染色 孵育液, 将 ATP 二钠盐、硫酸镁、硝酸铅、酒石酸钾钠按比例加入 0.1 mol/L Tris-马来酸缓冲液内, 调 pH 至 5.8 (对照组孵育液不含 ATP 二钠盐)。玻片上的破骨细胞培养 6~24 小时后经 2.5% 戊二醛 4℃ 固定后放入孵育液内, 37℃ 孵育 40 分钟, 再浸入 1.5% 硫化铵 1 分钟, 蒸馏水洗冲, 甘油明胶封片, 光镜观察。

2 结果

2.1 相差倒置显微镜观察 培养 30 分钟时破骨细胞即贴壁, 胞浆开始伸展, 2 小时后细胞形态清晰, 呈油煎蛋形、长条形或不规则形, 有片状或丝状伪足, 含几个到十几个细胞核。细胞形态随培养时间延长而不断变化。

2.2 TRAP 染色光镜观察 破骨细胞形态各异, 酶活性部位呈红色颗粒样沉淀, 分布于全部或大部分胞浆, 细胞核呈阴性, 同片的其他细胞不着色(图 1a), 对照组不显色。

2.3 TrATPase 染色光镜观察 破骨细胞形态同 TRAP 染色, 酶活性部位呈棕褐色颗粒样沉淀, 分布于整个胞浆或胞浆的大部分, 细胞核呈阴性(图 1b)。对照组不显色。

本课题受山东省卫生厅基金资助

作者单位: 271000 泰山医学院内科教研室(于明香);

上海医科大学老年医学研究中心(金慰芳、王洪复)



图1 a. TRAP 染色 分离培养的大鼠 OC 呈哑铃形,细胞浆呈红色,细胞核阴性 200 $\times$; b. TrATPase 染色 分离培养的大鼠 OC 呈漏斗形,细胞浆呈棕褐色颗粒状,细胞核阴性 200 $\times$

3 讨论

已公认酸性磷酸酶与破骨细胞及骨吸收有关,组织化学染色表明破骨细胞胞浆内含有丰富的酸性磷酸酶,但酸性磷酸酶并非破骨细胞所特有,因为成骨细胞也含有少量的酸性磷酸酶,TRAP 与 TrATPase 都是破骨细胞的酸性磷酸酶同功酶,为破骨细胞所特有,通常作为鉴别破骨细胞的重要标志^[3,4]。本文 TRAP 染色结果显示破骨细胞胞浆呈红色,核呈阴性。TrATPase 染色结果破骨细胞胞浆呈棕褐色颗粒状,细胞核呈阴性。TRAP 与 TrATPase 对破骨细胞都较特异,据报道后者特异性更高,推测 ATP 是破骨细胞内 TRAP 的特异性底物^[4]。

本文 TRAP 与 TrATPase 染色结果表明,该酶同样存在于体外培养的破骨细胞内,据此

可将体外培养所获破骨细胞与其他细胞清晰区分,为此可用于观察体外培养破骨细胞的生存时间与药物影响。

参 考 文 献

- 1 Votta BJ, Levy MA, Badger A, et al. Peptide aldehyde inhibitors of cathepsin K inhibit bone resorption both *in vitro* and *in vivo*. *J Bone Miner Res*, 1997, 12: 1396.
- 2 于明香,金慰芳,王洪复. 体外培养破骨细胞的功能观察. *中国骨质疏松杂志*, 1997, 3(3): 3.
- 3 Andersson GN, Marks SC. Tartrate-resistant acid ATPase as a cytochemical marker for osteoclasts. *J Histochem Cytochem*, 1989, 37, 115.
- 4 Lindunger A, Mackay CA, Ek-Rylander B, et al. Histochemistry and biochemistry of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and tartrate-resistant acid adenosine triphosphatase (TrATPase) in bone, bone marrow and spleen; implications for osteoclast ontogeny. *Bone Miner*, 1990, 10: 109.
- 5 section and longitudinal population study. *BMJ*, 1996, 313(7057): 586-90.
- 18 Sung KL, Young SP, Jae MP, et al. Lack of association between vitamin D receptor genotypes and osteoporosis in Koreans. *J Clin Endocr and Metab*, 1995, 80(12): 3677.
- 19 Pacini S, Nicastro L, Aterini S, et al. The determination of BB genotype of vitamin D receptors identifies patients at risk for osteoporosis. *Radiol Med Torino*, 1996, 92 (5): 520-4.
- 20 Yamagata Z, Miyamura T, Lijima S, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism and bone mineral density in healthy Japanese women. *Lancet*, 1994, 8(344): 1027.
- 21 Beavan S, Prentice A, Yan L, et al. Differences in vitamin D receptor genotype and geographical variation in osteoporosis. *Lancet*, 1996, 348: 136-7.