

1,25(OH)₂D₃ 诱导鼠骨髓细胞形成多核破骨细胞的实验研究

王晓敏¹ 于世凤² 杨宗萍¹ 刘忠厚³

摘要 目的:观察 1,25(OH)₂D₃ 对骨髓干细胞形成破骨细胞的调控作用,从而为破骨细胞骨吸收机制的研究奠定方法学的基础。方法:将不同浓度 1,25(OH)₂D₃ 加入原代培养的鼠骨髓细胞培养液中,利用抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色,监测不同时间点破骨细胞的形成情况,利用倒置光相差显微镜和扫描电镜检测所诱导形成破骨细胞的骨吸收功能情况。结果:培养前 3 天,细胞 TRAP 染色阴性,第 4 天出现 TRAP 阳性单核细胞,第 5 天出现 TRAP 阳性多核细胞,第 8 天 TRAP 阳性多核细胞达峰值。诱导破骨细胞形成的最佳 1,25(OH)₂D₃ 浓度是 10⁻⁸ M,在此浓度下,第 5 天偶见骨吸收陷窝,第 12 天骨吸收陷窝数达峰值。结论:1,25(OH)₂D₃ 能够诱导骨髓干细胞形成破骨细胞,为破骨细胞的体外分离培养提供了新的方法。

关键词 1,25(OH)₂D₃ 破骨细胞 抗酒石酸酸性磷酸酶 骨吸收陷窝

1,25 - DihydroxyvitaminD₃ Causes Formation of Multinucleated Cells with Several Osteoclast Characteristics in Cultures of Mouse Marrow

Wang xiaomin Yu shifeng Yang zongping Liu zhonghou

Stomatological Department, Peking University First Hospital, Beijing, 100034 China

Pathological Department, Peking University Stomatological Hospital, Beijing, 100081 China

ABSTRACT Objectives: We investigated the effect of 1,25 - DihydroxyvitaminD₃ on the generation of osteoclasts from bone marrow stem cells, so as to settle method foundation for study mechanism of osteoclastic bone resorption. Methods: 1,25(OH)₂D₃ at different concentration were added to bone marrow culture system. Cells were fixed and stained with tartrate - resistant acid phosphatase staining in different day (3,4,5,7,8) of culture, and bone slices in bone marrow culture system were examined with inverted phase contrast microscope to count the number of bone resorption pits. The bone resorption pits were examined on SEM. Results: The cells in bone marrow system were negative in TRAP staining in the third culturing day. The TRAP + mononuclear cells were found in the fourth culturing day. The TRAP + multinucleated cells(MNC) were found once in a while in the fifth culturing day. The number of TRAP + MNC was up to peak volume in the eighth culturing day. The most fit concentration in bone marrow cultures was 10⁻⁸ M. Under the concentration of 1,25(OH)₂D₃, bone resorption pits were found once in a while in the fifth culturing day. The number of bone resorption pits was up to peak volume in the twelfth culturing day. Conclusions: 1,25(OH)₂D₃ can induce bone marrow cells to form osteoclasts and the bone marrow culture system supplies a new method for culturing osteoclasts in Vitro.

Key words 1,25(OH)₂D₃ Osteoclast Bone resorption pits TRAP

破骨细胞是骨吸收的功能性细胞,破骨细胞功能异常活跃可导致骨质疏松症和牙槽骨病

理性骨吸收的发生。近年研究指出 1,25(OH)₂D₃ 对破骨细胞的形成起重要作用。本

¹ 国家自然科学基金重点项目 39330220 ² 北京大学口腔医学院 ³ 中国骨质疏松杂志社

作者单位:北京大学第一医院口腔科 100034

文主要观察不同浓度的 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 诱导骨髓干细胞形成破骨细胞的作用。

材料和方法

1. 玻片的制备: 将盖玻片常规清洗后, 切成 $6\text{mm} \times 6\text{mm}$ 的方块, 高温消毒, 备用。
2. 骨磨片的制备: 用新鲜牛股骨骨皮质, 按口腔医院病理科常规方法制成磨片。
3. 细胞培养: 取 5 周大小 NH 小鼠长骨骨髓细胞, 用 α -MEM 洗两遍, 将骨髓细胞重悬于 α -MEM (含 15% 胎牛血清, 青霉素 100U/ml, 链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 培养液中。加入 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 使培养液的最终浓度分别为 OM, 10^{-11}M , 10^{-10}M , 10^{-9}M , 10^{-8}M , 10^{-7}M 。以 $1.5 \times 10^6/\text{ml}$ 的细胞浓度种于 24 孔培养板 (购自 Costar 公司, 每孔直径 1.6cm), 0.5ml 细胞悬液/孔, 孔内加有玻片或骨磨片, 置于 37°C , 5% CO_2 培养箱内进行培养。每三天换液一次, 用 400 μl 新鲜培养液 (含相同浓度 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) 换掉 400 μl 旧培养液。
4. 倒置光相差显微镜观察及摄影: 观察不同时间点骨髓细胞的变化, 及在骨片上开始形成骨吸收陷窝时间, 以及随时间推移的变化, 摄影, 照片进行图象分析。计数在不同浓度 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 培养液中, 于不同时间点骨片上形成的吸收陷窝数。
5. 观察降钙素 (Salmon calcitonin 购自 Sigma 公司) 对破骨细胞形成的作用: 将降钙素加入含有 10^{-8}M $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 的培养液中, 使最终浓度为 (0, 0.1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml), 每三天换液一次, 每次换液添加相同浓度的降钙素和 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 。于培养第 8 天, 取出玻片进行 TRAP 染色。
6. HE 染色: 分别于培养 3, 4, 5, 7, 8 天取出玻片, 行 HE 染色观察破骨细胞分化的动态过程。
7. 酶组织化学监测破骨细胞的形成: 抗酒石酸性磷酸酶 (TRAP) 染色。于培养 3, 4, 5, 7, 8 天取出玻片, 4% 多聚甲醛固定后, 行 TRAP 特异染色, 计数 TRAP 阳性单核细胞簇和多核细胞数。

8. 非特异酯酶 (NSE) 染色: 风干玻片入孵育液 [2.5% α -醋酸奈酯 0.4ml; 0.1MPBS (PH6.3) 40ml; 六偶氮副品红 2.4ml], 37°C , 30 分, 冲洗, 封片。

9. 扫描电镜观察骨吸收陷窝: 取与骨髓细胞共同培养 8 天的骨片常规制作, 扫描电镜观察吸收陷窝的形态。

10. 统计学分析: 骨吸收陷窝数和 TRAP 阳性细胞数采用方差分析。

结果

一、骨髓细胞与玻片共同培养:

1. 形态学观察:

在 10^{-8}M $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 存在下, 前三天, 可见骨髓单核细胞满视野, 部分细胞贴壁, 部分细胞轻浮在玻片表面。HE 染色可见单核细胞分布均匀。TRAP 染色阴性。第四天, HE 染色示部分单核细胞聚集成团, 细胞间接触紧密, 细胞突起相互连接。TRAP 染色偶见阳性单核细胞。第五天, 可见单核细胞数目增多, 细胞募集现象更明显, TRAP 染色阳性单核细胞数目增多, 偶见 TRAP 染色阳性多核细胞。第七天 HE 染色显示, 融合成的多核巨细胞胞浆丰满, 细胞突起延展; 细胞核圆或椭圆型, 数目不等, 有的聚集核中央, 有的排列在细胞周边, 呈花环状。多核细胞周围围以单核细胞。TRAP 染色示许多紫红色多核巨细胞周围围以绿色的单核基质细胞, 细胞成簇或成团分布。在绿色的单核基质细胞间有许多散在的紫红色的单核细胞, 仍可见 TRAP 阳性单核细胞融合现象。第八天, TRAP 阳性多核细胞及单核细胞数达最多, 以后不再增加。(图 1, 2)

2. 不同浓度 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对骨髓细胞分化为 TRAP 阳性细胞的影响:

不同时间点不同浓度 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 存在下 TRAP 染色阳性的单核细胞团和多核细胞数不同。随时间推移 TRAP 阳性细胞数逐渐增加, 第 8 天达峰值, 以后逐渐降低, 于培养第 12 天降为最低值。从 10^{-10}M 浓度起 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 呈量

的依赖性增加 TRAP 阳性细胞数,于 10^{-8} M 浓度 TRAP 阳性细胞数达最大值,以后随浓度增加 TRAP 阳性细胞数不再增加,反而降低。

表 1 培养第 8 天不同浓度 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 诱导 TRAP 阳性细胞数

分组	TRAP ⁺ 多核细胞数	TRAP ⁺ 单核细胞簇数
0M	0	1.75 ± 0.71
10^{-11} M	0	2.13 ± 0.83
10^{-10} M	7.37 ± 1.41	6.50 ± 1.20
10^{-9} M	33.25 ± 2.66	16.63 ± 1.69
10^{-8} M	42.13 ± 3.09	19.38 ± 2.20
10^{-7} M	24.00 ± 2.00	22.88 ± 2.03

二、骨髓细胞与骨片共同培养:

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 浓度为 10nM 时,前 4 天的培养骨片上未见骨吸收陷窝,第 5 天,偶见骨吸收陷窝,第 8 天骨吸收陷窝数增加,以后随时间延长陷窝数增加,于培养第 12 天吸收陷窝数达峰值,吸收陷窝满视野。(图 3,4)

表 2 第 8、10 天各组骨吸收陷窝数($\bar{X} \pm \text{SD}$, 个, $n=8$)

组别	8 天	10 天	P 值
0M	0	0	
10^{-11} M	0	0	
10^{-10} M	84.25 ± 6.24	103.75 ± 11.62	$0.035 < 0.05$
10^{-9} M	339.00 ± 24.59	405.50 ± 14.80	$0.006 < 0.01$
10^{-8} M	617.50 ± 42.41	738.25 ± 63.36	$0.023 < 0.05$
10^{-7} M	221.75 ± 22.20	274.25 ± 23.94	$0.018 < 0.05$

表 2 各组数据经方差 9 检验:随时间延长,第 10 天与第 8 天相比,各组骨吸收陷窝显著增加,但 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 浓度低于 10^{-10} M 时对破骨细胞的形成不起作用。随 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 浓度增高,诱导骨髓细胞形成破骨细胞数增加,最有效的浓度为 10^{-8} M,以后浓度增加破骨细胞形成的数反而降低。

三、细胞进行非特异酯酶染色显示,大部分多核细胞为弱阳性反应,将同一玻片再进行 TRAP 染色,结果非特异酯酶弱阳性反应的大多数多核细胞 TRAP 反应强阳性,许多非特异酯酶弱阳性的单核细胞 TRAP 染色也呈强阳性。(图 5)

四、降钙素对破骨细胞形的作用:

降钙素对 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 诱导形成的 TRAP 阳性单核细胞簇无作用,而对 TRAP 阳性多核细胞的形成具有量的依赖性的抑制作用。虽然降钙素不能完全抑制破骨细胞的形成,但对所形成

的多核细胞骨吸收功能有较强的抑制作用,与骨片共同培养 8 天偶见骨吸收陷窝,吸收陷窝较小,至 12 天骨吸收陷窝未见明显增加。

五、扫描电镜观察:

可见圆形、椭圆形及不规则形骨吸收陷窝。由于脱矿和组织水解酶的作用,陷窝与周围正常骨组织相比明显凹陷,边界清晰,底面暴露出骨基质中的原纤维。平行排列的原纤维之间还可见许多纤细的纤维分支相互交错。(图 6)

讨论

本研究提示由鼠骨髓单核细胞形成的多核细胞具有破骨细胞的某些特征,首先多核细胞 TRAP 染色呈阳性反应,而 TRAP 是鉴定破骨细胞的标志酶^[1,2]。其次 TRAP 阳性多核细胞的形成受亲骨性激素的严格调控。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 是刺激骨吸收的激素,可显著地刺激 TRAP 阳性多核细胞的形成,而骨吸收抑制性激素降钙素,明显抑制这些多核细胞的形成。第三,TRAP 阳性多核细胞,也就是破骨细胞样细胞是由单核前体细胞融合而成的,不同时间点的染色观察可证明这一点。第四,在 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 下骨髓单核细胞与骨片共同培养 5—8 天,骨片上可见大量骨吸收陷窝。

本研究结果,TRAP 阳性单核细胞簇先于 TRAP 阳性多核细胞出现,说明 TRAP 阳性单核细胞是 TRAP 阳性多核细胞的前体细胞。而未用 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 组未见 TRAP 阳性多核细胞的形成。因此提示, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 不仅诱导未成熟前体单核细胞(TRAP 阴性)分化为成熟前体单核细胞(TRAP 阳性),而且使成熟的前体单核细胞融合为 TRAP 阳性的多核细胞^[2,3]。这种多核细胞符合真实破骨细胞的标准,能够在灭活骨片上形成骨吸收陷窝,降钙素抑制其骨吸收功能^[4,5]。

参 考 文 献

1. Turksen K, Kanehisa J, Opas M, et al. Adhesion patterns and cytoskeleton of rabbit osteoclasts on bone slices and glass, J

Bone Miner. Res. 1988, 4:389

- 2 Chambers TJ, Nijweide PJ, Cellular and molecular mechanism in the regulation and function of osteoclasts Vitam Horm. 1991, 46:41
- 3 Suda T, Takahashi N, Martin TJ, Modulation of osteoclast differentiation. Endocr. Rev. 1992, 13:66
- 4 MacDonald BR, Takahashi N, McManus LM, et al Forma-

tion of multinucleated cells that respond to osteotropic hormones in long term human bone marrow cultures. Endocrinology 1987, 120:2326

- 5 Hata T, Kukiat T, Akamine A, et al Trypsinized osteoclast-like multinucleated cells formed in rat bone marrow cultures efficiently form resorption lacunae on dentine. Bone 1992, 13:139

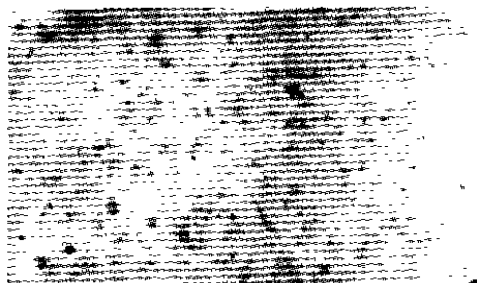


图1 鼠骨髓细胞培养第3天, TRAP染色阴性。光镜×200



图3 鼠骨髓细胞培养第5天, 骨片上偶见骨吸收陷窝。相差显微镜×100



图5 鼠骨髓细胞培养第8天, 多核细胞和部分单核细胞非特异酯酶染色弱阳性。光镜×200

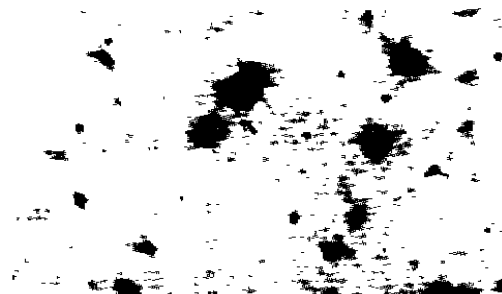


图2 鼠骨髓细胞培养第8天, TRAP染色阳性多核细胞及单核细胞明显增多。光镜×200



图4 鼠骨髓细胞培养第10天, 骨吸收陷窝数明显增多。相差显微镜×100

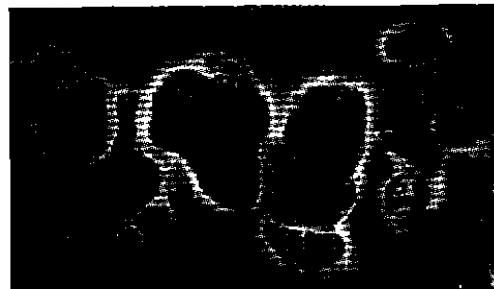


图6 扫描电镜示各种形态的骨吸收陷窝, 可见陷窝底面骨基质原纤维平行排列。3500