

高纯度破骨细胞分离培养与功能表达

高建军 顾淑珠 金慰芳 邓华云 王洪复

【摘要】 目的 获得足量高纯度活性破骨细胞进行破骨细胞生化学和分子生物学研究。方法 利用破骨细胞与 I 型胶原基质的高亲和力,先用 pronase 和 EDTA 作用除去未贴附的造血细胞及结合较疏松的间质细胞,继而用 0.01% 胶原酶作用进一步除去残留的间质细胞,最后用 0.1% 胶原酶作用得到高纯度破骨细胞悬液。分离细胞用抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 染色,荧光标记显示细胞骨架,RT-PCR 方法检测破骨细胞标志酶基因。结果 胶原基质培养结合酶消化可大大提高破骨细胞纯度,破骨细胞对降钙素反应,并表达 MT1-MMP, MMP-9, 组织蛋白酶 K 和 TRAP 基因 mRNA,可产生吸收陷窝。结论 利用兔破骨细胞与 I 型胶原的亲合力,可获得多量高纯度破骨细胞;并表达特征性基因。

【关键词】 破骨细胞; 培养; 纯化; 基因表达。

Isolation of highly enriched rabbit osteoclasts and their functional expression GAO Jianjun; GU Shuzhu, JIN Weifang, et al. Research Center of Geriatric Medicine, Shanghai Medical University, Shanghai 300032, China

【Abstract】 Objective To obtain enough amount of viable, highly enriched osteoclasts for the biochemical and molecular biological research of osteoclasts. **Methods** Rabbit osteoclasts were isolated by the modified methods of Kakudo et al. in which the high affinity of osteoclasts with collagen type I was used, the non-osteoclast cells were removed by enzymatic treatment. The morphology observation, TRAP staining, calcitonin reaction and resorption lacunae of obtained osteoclasts were conducted. The gene expression of some osteoclast marker enzymes was examined by RT-PCR. **Results** The typical characteristics of osteoclasts were demonstrated and the transcriptional expression of MT1-MMP, MMP-9 and cathepsin K in osteoclasts was also detected. **Conclusion** A large amount of highly enriched osteoclasts can be harvested by utilizing the affinity of rabbit osteoclasts with collagen type I. At least, at transcriptional expression level, the highly enriched osteoclasts express MT1-MMP, MMP-9 and cathepsin K.

【Key words】 Osteoclasts; Culture; Purification; Gene expression

破骨细胞骨吸收机制研究对阐明骨组织生理病理机制和代谢性骨病的防治具有十分重要的意义。由破骨细胞瘤分离或由骨髓和其他组织诱导培养形成的破骨细胞样细胞的许多细胞学特性尚不能肯定,因此从动物骨组织直接分离进行破骨细胞结构和功能研究仍是目前的最佳途径。与多数生物学和功能学研究要求不同,细胞生化和分子生物学研究要求大量高纯度破骨细胞。然而破骨细胞为高代谢的分化终末细胞,组织含量极少又非常脆弱,给破骨细胞(特别是大量高纯度破骨细胞)的分离培养带来困难,并成为其生化学和分子生物学研究进展的限制因素^[1]。本文作者根据文献报道的方法加以改良,从兔长骨机械分离结合酶消化提纯,建立高纯度

破骨细胞分离培养方法。

材料和方法

1. 动物:10 d 龄大白兔(100~120 g),购自上海医科大学实验动物部。

2. 主要试剂:I 型胶原(细胞基质 I-A 型)和 10 × Media 199 (GIBCO);中和液(200 mmol/L HEPES, 2.2% NaHCO₃, 50 mmol/L NaOH, pH7.4),自行配制;链酶蛋白酶 E (pronase E, Sigma 公司);细胞胶原酶(bacterial collagenase);培养液为 Media199 含 10% 胎牛血清;罗达明标记鬼笔环肽(rhodamine labeled phalloidin);益钙宁等。

3. 破骨细胞分离纯化:参照文献^[2],提前 1 天配制胶原凝胶。冰浴中将 8 ml 0.3% I 型胶原与 1 ml 10 × Media 199 混合后,加入 1 ml 中和液混合至暗红色。取混合物分注于 2 个直径 10 cm 的培养皿

作者单位:200032 上海医科大学老年医学研究中心骨代谢研究室

中,置 37℃ 孵育 4 h 以上。更换培养液孵育过夜。次日无菌分离兔四肢长骨,尽量清除软组织,在 Media 199 培养液中将长骨剪碎、混旋 30 s,静置 1 min。收集未分相细胞悬液,4℃ 下 500 r/min 离心 2 min,沉淀用培养液重悬(1×10^8 个/ml)后,分注胶原凝胶上,培养 4 h。预温 PBS 冲洗后加 0.001% pronase E 和 0.02% EDTA 的 PBS 室温作用 15 min,以除去未贴附造血细胞和结合较疏松的间质细胞。PBS 冲洗后,继用 0.01% 胶原酶室温作用 5 min,进一步除去残留的间质细胞。最后,用 0.1% 胶原酶 37℃ 消化 10 min 以收获高纯度的破骨细胞悬液,经洗涤重悬

后作 TRAP 染色^[3]和吸收陷窝观察^[4]冰浴中备用。

4. 降钙素反应:破骨细胞盖玻片培养 2 h,加益钙宁(终浓度 10^{-10} mol/L)培养 30 min, PBS 洗涤, 2.5% 戊二醛固定 10 min, 0.2% Triton X-100 作用 2 min, 罗达明标记的鬼笔环肽(5 U/ml)室温 20 min, PBS 洗涤后荧光显微镜观察。

5. 破骨细胞标志酶基因表达:破骨细胞用 TRI ZOL 试剂抽提 RNA,用 RT-PCR 法检测 MT1-MMP, MMP-9, TRAP 和组织蛋白酶 K 等 4 种破骨细胞标志酶基因的转录水平的表达,所用引物(见表 1)。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

表 1 PCR 引物

检测基因	正义	反义
MT1-MMP(387 bp)	5'-cccgctgggtgttcagac-3'	5'-ctcgcggagtcgaagtgggtgtcc-3'
MMP-9(663 bp)	5'-tgccggccactgtgcgcctccag-3'	5'-cactaggttcctcgttcgggtact-3'
组织蛋白酶 K(244 bp)	5'-agctggggagaagctgggaacaag-3'	5'-aggcacaacaalggggaacaaca-3'
TRAP(189 bp)	5'-aaggaggactacgtcgtcgtggcggc-3'	5'-tcacacagcagctagccacgcgtt-3'

结 果

在胶原凝胶中未分相细胞贴附 4 h,可见一些圆而大的多核细胞(图 1),0.1% 胶原酶收获细胞,玻片培养 2 h,破骨细胞贴附,胞浆逐渐伸展形态清晰,固定后 TB 染色可见破骨细胞中混杂较多单个核细胞。如用 pronase 和 EDTA 处理后,未贴附造血细胞及一些间质细胞被除去,进一步用 0.01% 胶原酶处理可提高收获破骨细胞的纯度(图 2)。

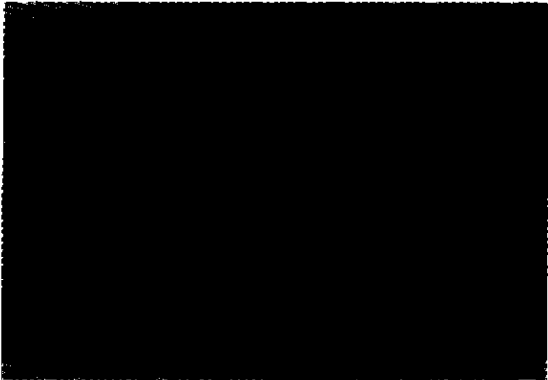


图 1 胶原凝胶上圆而大的多核细胞 物镜×20

所获细胞 TRAP 染色阳性,象牙片培养可产生吸收陷窝(图 3)。细胞骨架标记后 F-actin 呈红色丝状,益钙宁可使破骨细胞 F-actin 聚集、变短(图 4a、b)。应用 RT-PCR 方法证实破骨细胞表达 MT1-MMP, MMP-9, 组织蛋白酶 K 及 TRAP 4 种标志酶基因(图 5)。

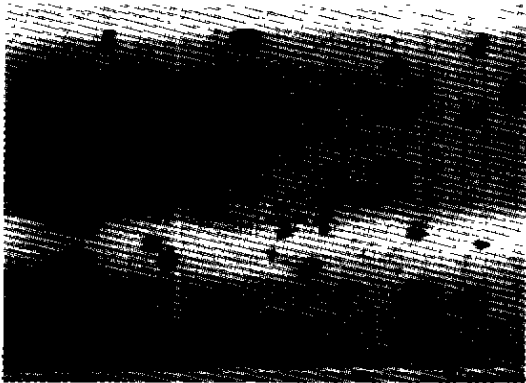


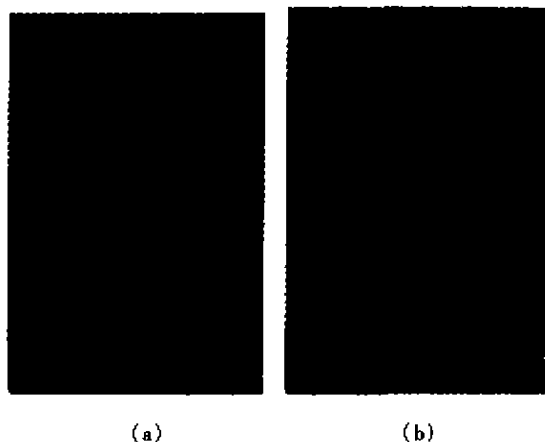
图 2 塑料培养皿提纯破骨细胞的 TRAP 染色 物镜×10



图 3 破骨细胞在象牙片上形成的吸收陷窝 物镜×10

讨 论

近年来,随着骨代谢研究的深入,多种破骨细胞



(a) (b)

图 4 破骨细胞降钙素反应

荧光显微镜观察显示降钙素作用下破骨细胞 F-actin 的改变
a. 对照培养, b. 加入 10^{-10} mol/L 益钙宁 物镜 $\times 20$

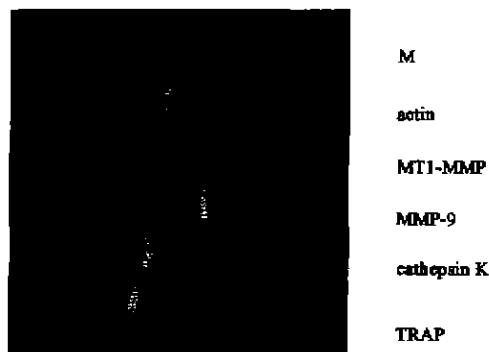


图 5 提纯兔破骨细胞标志酶基因表达

Mark, PCR 分子量标准, 从上到下条带长度分别为 1 000, 750, 500, 300, 150 和 50 bp

模型相继建立, 其中由前体细胞(骨髓细胞和脾细胞)诱导培养和长骨组织分离培养的破骨细胞模型受到重视。由长骨单纯机械分离可获得一定量破骨细胞, 操作比较简单、稳定, 但获得的破骨细胞纯度

较低(2%~3%), 适用于大多数生物学功能和药效学研究。密度梯度离心可提高破骨细胞纯度(20%~30%), 但对破骨细胞活性影响较大。其他如利用破骨细胞特异抗体标记技术的免疫磁珠法和显微操作技术的单细胞分选法, 由于设备和条件要求高, 应用范围受限。

利用破骨细胞与 I 型胶原凝胶的高亲和力, 可有效提高体外分离的破骨细胞纯度(85%)。获得细胞均具有典型的破骨细胞形态特征(多核、吸收器官等), TRAP 染色阳性, 可产生吸收陷窝, 对降钙素反应并表达特征性标志酶, 如 MMP-9, MT1-MMP, 组织蛋白酶 K 等。可制备细胞悬液, 从而能以一定破骨细胞数量接种于骨片、象牙及其他基质上, 因而是进行破骨细胞生化和分子生物学研究(特别是研究破骨细胞与骨基质相互作用时)较为理想的模型。但是由于收获细胞数目不多($1 \sim 6 \times 10^4$), 应用于基因分析检测时常限于定性分析和转录水平表达研究, 并且需要用 RT-PCR、RNase 保护分析法等高灵敏度分析方法, 也可用来检测一些表达丰富基因(如 MMP-9)的蛋白水平的变化。

参 考 文 献

- 1 Roodman GD. Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocrinol Rev*, 1996, 17:308-331.
- 2 Kakudo S, Miyazawa K, Kamada T, et al. Isolation of highly enriched rabbit osteoclasts from collagen gels: a new assay system for bone-resorbing activity of mature osteoclasts. *J Bone Miner Metab*, 1996, 14: 129-136.
- 3 于明香, 金慰芳, 王洪复, 等. 破骨细胞体外培养与形态观察. *上海医科大学学报*, 1996, 23:52-54.
- 4 高建军, 金慰芳, 王洪复. 骨片吸收陷窝光镜计数法定量测定破骨细胞功能. *上海医科大学学报*, 1998, 25:71-73.