

人成骨细胞与外周血单核细胞共同培养诱导破骨细胞样细胞

杨旭 杨庆铭 邓廉夫 许福平

【摘要】 目的 探讨人外周血单核细胞与原代人成骨细胞共同培养体外转化为破骨细胞样细胞的条件,并观察其体外生长、功能情况。**方法** 分别分离培养人成骨细胞,外周血单核细胞,并在含 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3(10^{-7} \text{ mol/L})$,地塞米松(10^{-8} mol/L)及巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)(25 ng/ml)的条件液中共同培养,用相差显微镜,抗酒石酸酸性磷酸酶染色(TRAP)观察破骨细胞样细胞生长情况,应用扫描电镜(SEM)观察骨片陷窝以反映其功能。**结果** 共同培养中的单核细胞逐渐融合;TRAP 染色阳性多核细胞在第 7 天明显增多;骨片陷窝呈现多种形态。**结论** 人原代成骨细胞与人外周血单核细胞共同培养可以诱导出破骨细胞样细胞,但应该选择分化程度较低的细胞以及控制接种密度。

【关键词】 成骨细胞; 单核细胞; 破骨细胞样细胞; 共同培养

Human primary osteoblasts and peripheral blood monocytes coculture to induce osteoclast-like cells YANG

Xu, YANG Qingming, DENG Lianfu, et al. Shanghai Institute of Traumatology & Orthopaedics; Department of Orthopaedics, Ruijin Hospital, Second Shanghai Medical University, Shanghai 200025, China

【Abstract】 Objective To explore the culture condition for coculture of primary human osteoblasts(OBs) and monocytes(MCs)in blood to induce osteoclast-like cells and observe their growth and function. **Method** OBs and MCs isolated separately were cocultured in conditioned medium containing $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3(10^{-7} \text{ mol/L})$, dexamethasone(10^{-8} mol/L) and MCSF(25 ng/ml). The growth and function of osteoclast-like cells were assessed by phase contrast microscope, TRAP staining and SEM. **Results** MCs fused to form multinucleated cells around OBs. Many TRAP-positive multinucleated cells appeared after 7 days. The pits on bone slices showed various forms. **Conclusion** The coculture of primary OBs and MCs in blood can induce osteoclast-like cells, while the differentiation stage of OBs and plating density are vital points for good results.

【Key words】 Osteoblast; Monocyte; Osteoclast-like cell; Coculture

破骨细胞是由其前体细胞融合而成的终末细胞,不具备分裂能力,通常位于骨转化活跃的钙化骨基质表面,体外分离较困难。国外用基质细胞或成骨细胞系细胞与破骨细胞前体细胞共同培养,在体外诱导破骨细胞样细胞的实验模型应用较广,目前国内尚无相关报道。笔者在以往实验中,采用骨髓法成功诱导出破骨细胞样细胞^[1]。本研究旨在探讨原代人成骨细胞与人外周血单核细胞共同培养诱导破骨细胞样细胞的实验条件,并观察其在体外生长、功能情况,为开展其生物学特性的相关研究提供基础。

材料和方法

1. 人成骨细胞分离培养:按参考文献[2]方法:取全髌置换术中的松质骨碎片,清除软组织,用组织剪将其剪碎,再用 Hank's 液反复冲洗至骨片变白;用 0.25% 胰蛋白酶消化骨片,前 3 次将消化的上清弃掉,自第 4 次起收集上清进行离心,1 000 rpm × 10 min;用含 10% 胎牛血清(Gibco, USA)和 10 mmol He-pes(Farco, H. K)的 DMEM 培养液将沉淀物吹打均匀,滤过后接种于 25 cm² 培养瓶内,每 3 天更换培养液至 70% 细胞融合。

2. 人外周血单核细胞分离:抽取健康志愿者静脉全血 30 ml,用 Hank's 液按 1:1 体积比混匀,并将混合物缓慢铺于淋巴细胞分离液(上海华精)上,离心,3 000 r/min × 30 min;小心吸取单个核细胞层,

基金项目:上海市科委重点基础研究项目(015C14038)

作者单位:200025 上海市伤骨科研究所 上海第二医科大学附属瑞金医院骨科

Hank's 液洗 2 遍后,接种单个核细胞,1 h 后洗掉未贴壁细胞,贴壁的外周血单核细胞经 Giemsa 染色以及抗 CD14 免疫组化染色鉴定,纯度可达 90% 以上(图 1)。

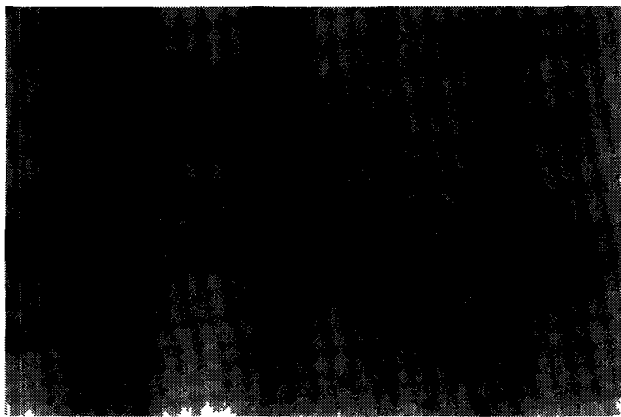


图 1 CD14 阳性的外周血单核细胞,苏木素染 $\times 1000$

细胞。

2. 抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色观察:共同培养后第 1 天,玻片上未见 TRAP 阳性细胞;第 3 天玻片上偶见 TRAP 阳性细胞;第 7 天 TRAP 阳性多核细胞明显增多,镜下胞浆呈玫瑰红色,细胞核因苏木素复染而呈蓝色(图 2)。

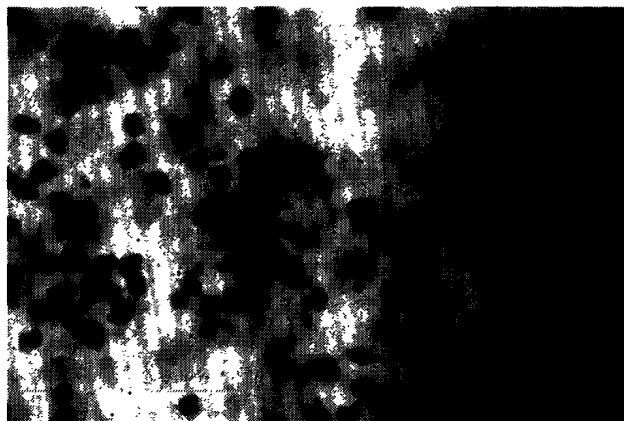


图 2 多核 TRAP 染色阳性的破骨细胞样细胞 $\times 200$

3. 共同培养:将上述 70% 细胞融合的人成骨细胞制成 8×10^4 细胞/ml 的悬液,吸取 400 μ l 加入 24 空板(内置盖玻片);吸取 200 μ l 加入 96 空板(内置骨片),4 h 后冲掉未贴壁的细胞,分别换 1 ml 和 25 μ l 新培养液,继续培养 20 h 后,吸除孔板内培养液,将人单个核细胞以 2×10^6 细胞/ml 密度同体积接种其上,1 h 后取出玻片与骨片,用 Hank's 液冲洗未贴壁细胞,玻片与骨片置入新 24 空板内,加入含 1×10^{-7} mol/L $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Sigma, USA), 1×10^{-8} mol/L 地塞米松 (Sigma, USA) 及 25 ng/ml M-CSF (R&D System, USA) 条件培养液培养 1 ml,每 3 天换液。

4. 相差显微镜观察:用倒置相差显微镜 (Olympus, Japan) 观察细胞诱导过程。

5. 抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色:共同培养第 1, 3, 7 天取长有细胞的玻片固定后,用白细胞酸性磷酸酶试剂盒 (Sigma, USA) 进行抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色,按说明书操作。观察计数 TRAP 染色阳性多核(3 个或多于 3 个)细胞。

6. 扫描电镜(SEM)观察:共同培养第 14 天将骨片浸入 0.25 mol/L NH_4OH 中 24 h,再经蒸馏水超声清洗 3 次,每次 7 min,按常规方法制备扫描电镜标本,扫描电镜下 (Philips XL30ESEM) 观察陷窝,摄片。

结 果

1. 相差显微镜观察:共同培养后,单核细胞随培养时间的增加,局部聚集现象增多,表现为胞浆伸展后在成骨细胞周围逐渐融合成多核的胞体较大的

3. 扫描电镜(SEM)观察:扫描电镜下骨片陷窝呈圆、椭圆、腊肠、葡萄串、不规则等各种形态,陷窝边缘清晰,深浅不等,深者底面粗糙(图 3)。

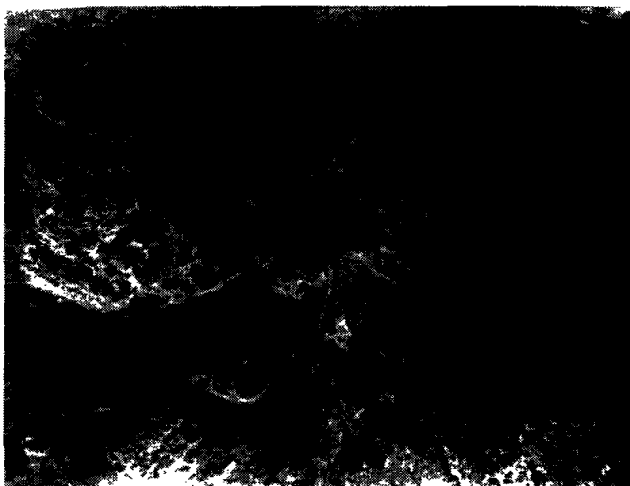


图 3 扫描电镜下骨片陷窝形态 $\times 600$

破骨细胞和成骨细胞是骨组织两种重要的细胞成分,它们分别具有吸收骨和形成骨的功能:两者功能间的“偶联”关系将直接影响骨代谢的状况。与成骨细胞相比较,我们对于破骨细胞的生物特征认识还不够深入,这与研究破骨细胞的基本实验手段—细胞培养技术相对滞后有直接关系。破骨细胞体外培养相对成骨细胞较困难,主要表现在:①破骨细胞

被包埋于钙化的骨基质中,其对于分离技术要求较高;②破骨细胞数量相对较少,而且它们在离体情况下生命力脆弱;③目前尚缺少可供实验室使用的破骨细胞的细胞株。国外常见用基质细胞系细胞或成骨细胞系细胞与破骨细胞前体细胞共同培养,在体外诱导破骨细胞样细胞以满足相关研究的需要。

基质细胞或成骨细胞系细胞与破骨细胞前体细胞共同培养,体外诱导破骨细胞样细胞的理论基础,源于 Rodan 等^[3]提出的成骨细胞可能参与破骨细胞的分化和活化的假说。Takahashi 等^[4]在 1988 年将小鼠脾细胞与从新生小鼠颅盖骨分离的成骨细胞共同培养后,成功诱导了典型的破骨细胞样细胞,使 Rodan 等的假说得以证实。目前常用的基质细胞系细胞或成骨细胞系细胞包括:大鼠源性 UMR106 基质细胞株细胞,小鼠源性 ST2 基质细胞,人源性 MG-63 成骨细胞系细胞等;破骨细胞前体细胞主要使用骨髓单核细胞,外周血单核细胞,脾细胞等^[5,6]。通常两种细胞在含有所谓骨吸收刺激因子(既有单独使用的,也有联合应用的,常见的有维生素 D₃,地塞米松,甲旁腺素等)和巨噬细胞集落刺激因子的条件培养液的干预下,经过 1 周左右时间即可出现大量抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色阳性的多核破骨细胞样细胞。国内目前尚未开发上述细胞系细胞,我们将原代成骨细胞用于诱导实验。复习文献可以发现原代基质细胞、成骨细胞很少用于类似实验,本实验中也发现,可能由于不同批次分离培养的人原代成骨细胞的性状差异,诱导结果明显不同。我们发现如果等到成骨细胞高度融合,大量钙化结节已出现时收集接种细胞,则很难诱导出破骨细胞样细胞。

近来,随着骨保护素理论的阐明,研究者发现基质细胞和成骨细胞表达的 OPG 和 OPGL 是其调控破骨细胞分化、活化的关键,维生素 D₃、地塞米松、甲旁腺素等骨吸收刺激因子的加入实际是增加了成骨细胞或骨髓基质细胞 OPGL/OPG 表达比值^[7],使实验向着有利于促进破骨细胞素细胞分化、活化的方向发展。Thomas 等^[8]发现:各种分化阶段小鼠成骨细胞都能在维生素 D₃ 的作用下增加 OPGL/OPG 表

达比值,但高分化细胞变化幅度小于低分化细胞,这一结果有助于理解为什么共同培养时要选用低分化的骨髓基质细胞和成骨细胞。我们在实验中发现两种细胞的接种密度直接影响实验成败,不能认为增加成骨细胞的接种密度即可增加其传递给破骨细胞前体细胞的分化、活化信号。Grooth 等^[9]认为成骨细胞的接种密度能够影响破骨细胞样细胞的诱导率,低密度(1×10^4 细胞/cm²)优于高密度(2.5×10^4 细胞/cm²)。由于高密度的成骨细胞中碱性磷酸酶合成量及钙结节数量都多于低密度的成骨细胞。在诱导破骨细胞样细胞的过程中,这种成骨细胞低密度接种优于高密度接种的现象可能与低密度成骨细胞保持低分化状态有关。我们认为在大量钙化结节出现前收集接种成骨细胞将有利于诱导率。总之,人原代成骨细胞不能算是可用于诱导破骨细胞样细胞的最佳选择对象,但如果能够选择分化程度较低的细胞以及很好地控制接种的密度,还是能够诱导出经典的破骨细胞样细胞。

参 考 文 献

- 1 何涛,杨庆铭,邓廉夫,等.成人破骨细胞骨髓培养法的建立与鉴定.中华骨科杂志,1999,19:59-62.
- 2 张兴凯,杨庆铭,邓廉夫,等.成人成骨细胞体外培养.中华外科杂志,2000,38:51-53.
- 3 Rodan GA, Martin TJ. The role of osteoblast in humoral control of bone resorption. Calcif Tiss Int, 1981, 33:349-351.
- 4 Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, et al. Osteoblastic cell are involved in osteoclast formation. Endocrinology, 1998, 123:2600-2602.
- 5 Yosuke F, Julian M, Afsaneh S, et al. The human osteoclast precursor circulates in the monocyte fraction. Endocrinology, 1996 137: 4058-4060.
- 6 Asaneh S, Yosuke F, David W, et al. Radio-opaque agents in bone cement increase bone resorption. JBJS, 1997, 79-B(1):129-134.
- 7 Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. Science, 2000, 289:1504-1508.
- 8 Thomas GP, Baker SUK, Eisman JA, et al. Changing RANKL/OPG mRNA expression in differentiating murine primary osteoblasts. J Endocrinology, 2001, 170:451-460.
- 9 Grooth R, Kawilarang HE, Sande CM, et al. The role of osteoblast density and endogenous interleukin-6 production in osteoclast formation from the hemopoietic stem cell line FDCPMIX C2GM in coculture with primary osteoblasts. Calcif Tissue Int, 1998, 63:57-62.

(收稿日期:2002-11-06)

热烈祝贺:中国骨质疏松杂志已入选国家科技部中国科技核心期刊

全国各地邮局均可订阅,邮发代号:82-198