

高产量高纯度的破骨细胞分离培养

刘波 于世风 庞淑珍

【摘要】 目的 获得高产量高纯度破骨细胞,为骨吸收的体外研究提供丰富的细胞来源。方法 将经典分离乳兔四肢骨破骨细胞的方法与 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 诱导骨髓干细胞生成破骨样细胞的方法相结合,并应用 0.05% 胰蛋白酶/0.02% EDTA 联合消化的方法将其纯化。**结果** 该方法可诱导生成大量的破骨样细胞,0.05% 胰蛋白酶/0.02% EDTA 联合消化可使破骨细胞纯化率达 95%。诱导生成的破骨样细胞 TRAP 染色阳性,体外培养具有噬骨能力。**结论** 该培养方法可产生大量高纯度的破骨样细胞,可为破骨细胞的体外分子生物学研究提供丰富的细胞来源。

【关键词】 多核巨细胞; 破骨细胞; 培养; 纯化

Isolation of highly enriched and purified rabbit osteoclasts and osteoclast-like cells LIU Bo, YU Shifeng and PANG Shuzhen Department of Oral Pathology, Peking University School of Stomatology, Beijing 100081, China

【Abstract】 Objective To obtain highly enriched and purified osteoclasts in enough amount for the study of the mechanism of bone resorption *in vitro*. **Methods** The classical osteoclastic isolation method from limbs of rabbits combined with the method of induction of the bone marrow cells was used to form osteoclast-like cells in the presence of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Mature osteoclasts and osteoclast-like cells were purified by 0.05% trypsin/0.02% EDTA digestion. **Results** A large number of rabbit osteoclast-like cells and were produced, and 95% purified osteoclasts were obtained after 0.05% trypsin/0.02% EDTA digestion. The osteoclast-like cells were positive for the TRAP staining and capable of bone resorption *in vitro*. **Conclusions** This method can produce highly enriched and purified osteoclasts in enough amount for biochemical and molecular biological research.

【Key words】 Multinucleated giant cells; Osteoclasts; Culture; Purification

破骨细胞是一种高度分化的多核巨细胞,在生理性骨改建和病理性骨吸收中具有重要的作用。破骨细胞的分离培养见于 80 年代,1982 年 Chamber 首次从乳兔四肢骨分离培养出成熟破骨细胞^[1],为骨吸收的体外研究奠定了基础。我国于世风等^[2,3] 1988 年率先引进了破骨细胞的培养方法并加以改良。然而经典分离培养方法获得的破骨细胞数量有限,纯化困难。由于体外分离培养的破骨细胞无增殖能力,存活时间只有 7~14 天,因此经典分离培养的破骨细胞只适合于一些生物学功能和药效学研究,无法满足破骨细胞分子生物学方面的研究需要。如何获得高量、高纯度的破骨细胞对研究破骨细胞的生物学具有重要意义。近 15 年以来,不少的学者曾经尝试从不同的种属的动物(如鸟类、啮齿类动物)分离培养成熟的破骨细胞^[4-7],企图解决上述问

题,然而由于骨组织里存在的正常成熟破骨细胞数量有限,因此高产量高纯度破骨细胞的获得一直是破骨细胞体外骨吸收研究的一个难题。本研究将传统成熟破骨细胞体外培养法与诱导的方法相结合,并用酶消化法将其纯化,探讨高量高纯度破骨细胞的培养方法。

材料和方法

1. 材料

(1)动物:新生日本大耳白兔。(购自中国兽药监察所)。

(2)主要药品及试剂: $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Sigma)、 α -MEM 培养基(Gibco),胎牛血清(武汉三利公司),胰蛋白酶(sigma),EDTA(sigma),35 mm,60 mm 培养皿、24 孔板(Corning),TRAP 染色试剂盒(中国医学科学院血液研究所)。

2. 方法

(1)牙磨片的制备及处理

基金项目:国家自然科学基金(39830430)重点项目资助

作者单位:100081 北京,北京大学口腔医院病理科

将新鲜人牙纵切成 $100\ \mu\text{m}$ 。用金刚砂石磨薄至 $10\ \mu\text{m}$ 。超声波清洗后,浸泡于含青霉素 $1000\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 、链霉素 $1000\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 的 D-Hanks 液中,换液 3 次,每次 30 min。置入含青霉素 $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 、链霉素 $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 的 D-Hank's 液置换 2 次,每次 20 min。最后置 α -MEM 培养液中浸泡备用。

(2)玻片的制备:将玻片切成 $1 \times 1\ \text{cm}^2$ 大小,泡酸过夜,自来水冲洗干净,蒸馏水洗 3 遍,烤箱烤干,干热消毒灭菌后备用。

(3)成熟破骨细胞的分离培养及纯化:出生 24 h 内的新生兔断颈处死,无菌取其四肢长骨,在 D-Hanks 液中去净附着在其表面的软组织和软骨骺。将其骨干在 α -MEM 培养基(含 15% 胎牛血清, $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 青霉素和 $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素)中纵行剖开,轻刮骨的髓腔表面直至颜色变白,用吸管反复多次吹洗骨髓腔和骨干的内表面,取出骨片,吸取悬液置离心管内, 4°C $1000\ \text{r}/\text{min}$ 离心 10 min,弃上清,加 4 ml α -MEM 培养液吹打均匀,接种于 60 mm 培养皿。 37°C CO_2 培养箱孵育 20 h。吸取培养皿中的 α -MEM 培养液于离心管内, D-Hanks 液冲洗 2 遍,将洗涤下的液体也置于离心管内。 0.5% 胰蛋白酶/0.02% EDTA 消化培养皿内的细胞 10 min 左右,将消化下的细胞也置入上述离心管内。 D-Hanks 冲洗培养皿 2 遍, α -MEM 培养液终止胰酶的作用。倒置相差显微镜观察,如残留的单核细胞较多可重复所有上述操作。 TRAP 染色,显微镜下计数阳性多核细胞。

(4) $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 诱导破骨样细胞的生成:将上述收集于离心管内的细胞,在 4°C $1000\ \text{r}/\text{min}$ 下离心 10 min,弃上清,加适量 α -MEM 培养基,调整细胞密度约 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 左右,将细胞接种于 24 孔板中,其中 24 孔板内分别置 $1 \times 1\ \text{cm}^2$ 玻片和牙片,使细胞接种密度为 $2 \times 10^6/\text{cm}^2$ 左右。分别分为加 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 组或不加 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 组,使 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 组终浓度为 10^{-8}M 。置 37°C 5% CO_2 培养箱内培养。隔天换液 1 次。分别在诱导第 3, 6, 9 d 取玻片,染色观察。

(5)抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 染色:按试剂盒所示进行。

(6)骨吸收陷窝分析:于诱导后不同时间观察牙片上破骨细胞的骨吸收陷窝变化,并摄影。

结 果

1. 成熟破骨细胞的分离培养及纯化:倒置相差显微镜下观察分离培养的成熟破骨细胞,可见破骨细胞数量较少,破骨细胞混在大量的单核基质细胞

中,在 $1 \times 1\text{cm}^2$ 的玻片上可分离得到 10 个破骨细胞左右。用 0.5% 胰蛋白酶/0.02% EDTA 作用 10 min 后,大部分单核基质细胞脱落,培养皿上大部分细胞为多核巨细胞。破骨细胞纯化率在 95% 以上。成熟破骨细胞体积大,多核,胞浆丰满,细胞突起延展。细胞核大小数目不一,圆形或椭圆形,有的积聚在细胞中央,有的排列在细胞周边(见图 1)。TRAP 染色见纯化后的破骨细胞胞浆呈紫红色(见图 2)。每只乳兔分离产生的成熟破骨细胞纯化后,在 60 mm 培养皿上可获得 $1.566 \times 10^3 \pm 0.404 \times 10^3$ 个细胞。

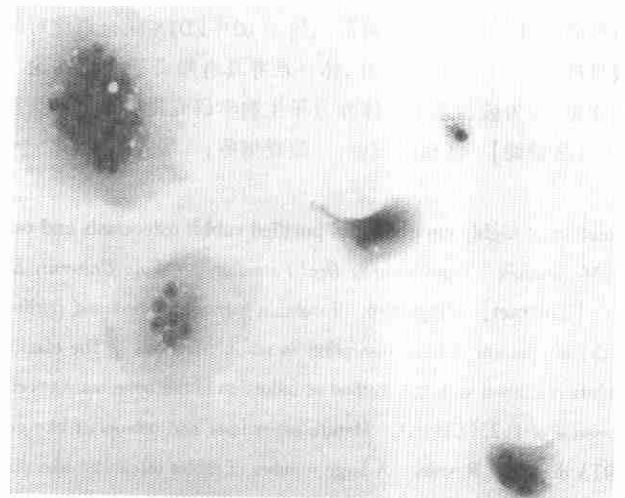


图 1 纯化后的成熟破骨细胞 HE 染色 (HE, $\times 200$)

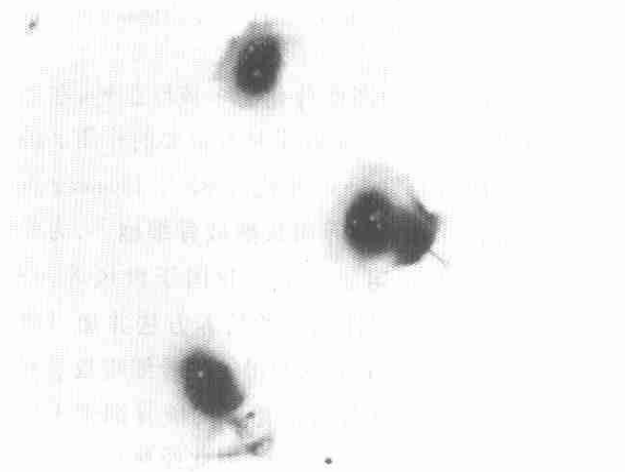


图 2 纯化后成熟破骨细胞的 TRAP 染色阳性 (TRAP, $\times 200$)

2. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 诱导破骨样细胞的生成:将洗涤下的细胞接种于培养皿后,行 TRAP 染色,偶见或不见 TRAP 阳性细胞,说明洗涤下的细胞绝大部分为单核细胞,混合的破骨细胞极少。在诱导第 6 d 左右可见单核细胞中开始有多核细胞生成,诱导生成的破骨细胞体积大,多核。到诱导第 9 d 多核巨细胞数量达到高峰(见图 3)。诱导形成的多核细胞

TRAP 染色阳性(见图 4),与牙片共培养后在培养第 5d 即可形成明显的骨吸收陷窝(见图 5)。说明诱导后的多核巨细胞具有骨吸收功能,为破骨样细胞。在 $1 \times 1 \text{ cm}^2$ 的玻片上可诱导生成 301 ± 35 个破骨样细胞。

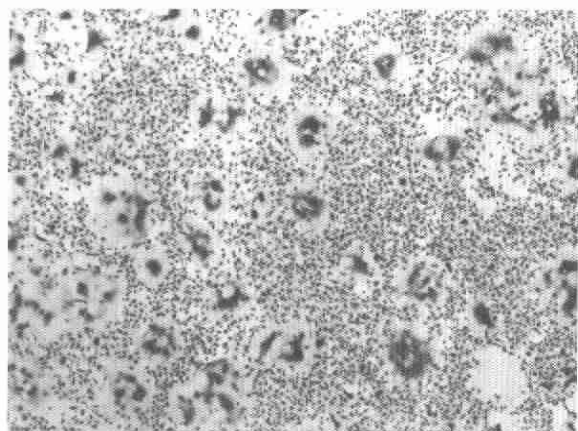


图 3 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 诱导第 9d 生成大量的破骨样细胞(HE, $\times 100$)



图 4 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 诱导生成破骨样细胞纯化后 TRAP 染色阳性 (TRAP, $\times 200$)

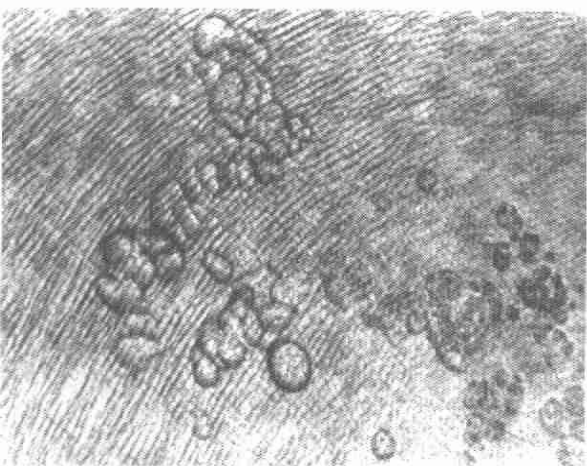


图 5 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 诱导第 5d 生成的破骨样细胞在牙磨片上形成的骨吸收陷窝(倒置相差显微镜, $\times 200$)

讨 论

破骨细胞的分离培养最初由 Chamber 提出,该方法分离的成熟破骨细胞数量有限,混有大量的单核细胞,没有经过纯化。只适于将分离的细胞与骨片共培养,体外观察外来因素对破骨细胞的骨吸收功能的影响,极大的限制了破骨细胞生物学的研究。对于破骨细胞的纯化文献报道较少。1992 年 Tezuka 等^[8]用链酶蛋白酶消化的方法将成熟破骨细胞纯化,产生了较高纯度的破骨细胞,然而由于骨组织里存在的破骨细胞本身数量有限。但该方法获得的破骨细胞数量有限。有学者^[9,10]曾尝试从骨巨细胞瘤中大量存在的破骨样多核巨细胞分离纯化破骨样细胞作为骨吸收体外模型,由于骨巨细胞瘤标本获取困难并且病变中破骨样多核巨细胞为瘤样病变反应性细胞,难以代替正常破骨细胞,因此从探讨从正常骨组织中分离高量高纯度破骨样细胞的分离培养具有重要的意义。本研究将常规的分离方法与诱导相结合,并用酶消化的方法获得了高纯度的破骨细胞,为破骨细胞生物学的研究奠定了基础。该方法主要是依据破骨细胞具有较高贴壁能力及抗胰蛋白酶的 特性,用 0.5% 胰蛋白酶/0.02% EDTA 将贴壁能力较弱的单核基质细胞消化下来,留下了贴壁能力较高的破骨细胞,将消化下来的单核细胞由于诱导,由于乳兔骨髓细胞数量巨大,诱导产生的破骨样细胞数量远远多余鼠类等动物,因此该方法不仅节约实验动物,而且可产生高量的破骨样细胞,诱导产生的多核巨细胞 TRAP 染色阳性,体外与骨片共培养具有噬骨能力,是一种具有破骨能力的破骨样细胞。

该实验方法操作简单,产生的破骨样细胞量多,在 $1 \times 1 \text{ cm}^2$ 的玻片上诱导产生的破骨细胞产量约为正常分离的成熟破骨细胞的 30 倍,而且 0.5% 胰蛋白酶/0.02% EDTA 消化可使破骨细胞纯度达 95% 以上,因此适合于破骨细胞生化学方面的研究,尤其适合于凝胶迁移等分子生物学研究,可提供足够的核提取物来研究破骨细胞分化过程中一些转录因子的变化。

综上所述,对于高量高纯度破骨细胞的分离培养有以下几点体会:该方法的纯化是建立在组织中不同细胞贴壁能力不同而使细胞加以纯化,破骨样细胞良好的贴壁能力是获得成功的前提条件。因此,在培养中应严格操作杜绝污染为细胞生存提供有利的空间。酶作用时间不宜过长,否则会造成对

(下转第 396 页)

标。由经验医学向循证医学转变;实现根据每个病人的机体状况和疾病发展方向,实施个体化治疗方案;通过规范化、标准化为病人提供医疗、预防、保健、心理、康复,健康教育的多层次服务,还要满足病人疾病以外的人文精神、人性化服务。

第三,积极推进骨质疏松症学科建设与发展。

骨质疏松症防治在医疗市场的需求比是很大的,发展骨质疏松专科亦是大势所趋。当前,我国骨质疏松症的各种诊疗手段都是寓于医院各有关科室,在一个医院中由多学科都在开展骨质疏松症的诊疗工作,这种学科结构和服务模式,不仅使病人求医就诊无所适从,带来麻烦,而且也难以给病人最佳的治疗,还给病人增加经济负担。要改变这种状况,适应科学技术的“科学技术化、技术科学化”及“大医学”的新趋势,我们倡导在综合医院中组建骨质疏松症医疗中心,把医院诊治骨质疏松症的学科都统一在“中心”里,形成名副其实的大医学骨质疏松症学科,按照整体医疗的思维,整合人力资源,以及医疗技术和设备的优势,形成综合诊断、综合治疗的各方面等“集团作战”的新模式,以期达到最佳治疗效果。

第四,倡导大家积极做好科普工作。

健康是每个人的基本需求,也是人人追求的目标,而人们要获得健康,最重要的是提高人们的自我保健能力。由此需要把知识教给大众,科普工作愈显重要,科普工作是科技工作者,也是我们学术组织的重要工作组成部分,赋予重要使命和职责,我们应该看到,目前我国人们的科学素质并不乐观,科普工作还相当薄弱。希望我们学会把科普工作富于学术活动中,采用多种形式使科技人员与大众保持沟通,把科技成果与提高大众科学素质有机结合,为促进健康、提高生命质量作出贡献。

最后,希望全体代表聚精会神开好会,营造一个全社会、整个卫生系统都关心、支持、促进骨质疏松症防治工作,开拓创新的大环境,让人民大众特别是老年人都享有人人健康长寿的医疗保健服务,早日实现全民族健康素质显著提高的目标。

2004 年 8 月 16 日

(上接第 411 页)

细胞的损伤。应短时多次纯化。纯化时应在镜下观察纯化效果,达到效果后应尽快终止消化,并且要彻底终止消化液作用,否则残留的胰酶和 EDTA 将会损伤细胞。诱导高量破骨样细胞形成时,细胞的接种密度尤为关键,接种密度过小,骨髓干细胞数量过少,诱导的多核样细胞数量少。我们的经验提示接种密度以 $2 \times 10^6/\text{cm}^2$ 为佳。一般 1 只乳兔产生的细胞可接种 2 块 24 孔板。

本研究表明利用 0.5% 胰蛋白酶/0.02% EDTA 联合消化的方法以及将成熟分离与诱导破骨细胞相结合的方法可获得高产量和高纯度的破骨样细胞,可为破骨细胞的体外研究提供丰富的细胞来源。

参 考 文 献

- 1 Chambers TJ, Magnus CL. Calcitonin alters behavior of isolated osteoclasts. *J Pathol*, 1982, 136(1): 27-39.
- 2 史凤芹,于世风. 体外破骨细胞分离培养方法的建立. *中华骨科杂志*. 1994, 14(1): 43-45.
- 3 史凤芹,于世风,庞淑珍,等. 兔破骨细胞体外分离培养方法的改

良. *中华病理学杂志*. 1996, 25(6): 379-380.

- 4 史凤芹,于世风,庞淑珍,等. 鸡破骨细胞分离培养方法的建立. *中国骨质疏松杂志*. 1995, 1(2): 101-103.
- 5 Ouesler MJ, Collin-Osdoby P, Anderson F, et al. Isolation of avian osteoclast: Improved techniques to preferentially purify viable cells. *J Bone Miner Res*, 1991, 6(4): 375-385.
- 6 Cllin-Osdoby P, Oursler MJ, Webber D, et al. Osteoclast-specific monoclonal antibodies coupled to magnetic beads provide a rapid and efficient method of purifying avian osteoclasts. *J Bone Miner Res*, 1991, 6(12): 1353-1365.
- 7 Chamber TJ, Mcsheehy PMJ, Thomson BM, et al. The effect of calcium-regulation hormones and prostaglandins on the bone resorption by osteoclasts disaggregated from rabbit long bone. *Endocrinology*, 1985, 116(1): 234-239.
- 8 Tezuka K, Sato T, Kamioka H, et al. Identification of osteopontin in isolated rabbit osteoclasts. *Biochem and Biophy Res Commun*, 1992, 186(2): 911-917.
- 9 吴惠茜,谢丹,张荫. 骨巨细胞瘤中多核巨细胞的分离提纯及原代培养. *中华病理学杂志*, 2000, 29: 66-67.
- 10 刘波,于世民,庞淑珍. 骨巨细胞瘤中多核巨细胞的纯化及其性质的探讨. *北京大学学报(医学版)*, 2003, 35(1): 23-27.

(收稿日期: 2004-10-23)