

# 两种方法培养大鼠破骨细胞的比较研究

张鲲 陈晓亮 王德春 胡有谷

**摘要：**目的 比较分析直接分离培养的 Wistar 大鼠破骨细胞(osteoclast, OC)和诱导培养的 Wistar 大鼠破骨样细胞(osteoclast-like cell, OLC)的形态和功能的差异,为体外药物干预试验奠定基础。方法 采用两种培养法,即从新生(24 h 内)的 Wistar 大鼠的四肢长骨骨髓腔内壁机械分离成熟 OC 直接培养和  $10^{-8}$  mol/L 的  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  诱导 4 周龄 Wistar 大鼠骨髓单核细胞形成 OLC 的方法,对获得的 OC/OLC 进行形态和破骨功能观察。结果 两种方法都培养出了抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)染色阳性的多核细胞,诱导法获得的破骨细胞数量较多( $P < 0.05$ )。成熟 OC 与诱导获得的 OLC 形态特征相似,但后者在骨片上形成的陷窝较小而浅。结论 直接分离培养法可获得骨吸收功能较活跃的 OC,但数目较少,适合骨吸收功能分析、破骨迁移黏附、凋亡研究及单细胞分子生物学研究。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  诱导鼠骨髓单核细胞形成的 OLC 数量较多,但骨吸收功能较差,适合用于破骨细胞分化发育过程的研究。

**关键词：**破骨细胞；细胞培养；骨吸收

**Comparative study on two different culturing methods of osteoclasts of rats** ZHANG Kun, CHEN Xiaoliang, WANG Dechun, et al. Qingdao University, Qingdao 266003, China

**Abstract:** **Objective** To study the morphological and functional difference between osteoclast (OC) and osteoclast-like cells (OLC) cultured by different means and to provide the basis for further investigation on the regulation of bone resorption by OC. **Methods** OCs were isolated from the long bones of neonatal Wistar rats, and OLC were induced from the marrow mononuclear cells of 4-week-old of Wistar rats by  $10^{-8}$  mol/L  $1,25(\text{OH})_2\text{VitaminD}_3$  *in vitro*. The morphology and resorption function were observed for OC and OLC. **Results** The tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) positive polykaryocytes were obtained by both means, and the amount of OLC was more than that of OC ( $P < 0.05$ ). The appearance of OLC was similar to that of OC, but the resorption function of OLC was not as stronger as OC. **Conclusions** OC derived directly from long bones is less in number, but is active in bone resorption, thus can be appropriate for the study of bone resorption, migration and adhesion, apoptosis and monocellular molecular biology. The bone resorption ability of OLC obtained by inducing means is more in number, but less active and is better for the study of OC differentiation and development.

**Key words:** Osteoclast; Cell culture; Bone resorption

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和设备：** $\alpha$ -MEM 培养基(Gibco 公司)、胎牛血清(Gibco 公司)、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Sigma 公司)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色试剂盒(Sigma 公司)、超净工作台、 $\text{CO}_2$  培养箱、倒置显微镜(Nikon 公司)、扫描电子显微镜(JSM-840)、超声波清洗机。

**1.1.2 动物：**4 周龄雄性 Wistar 大鼠 5 只和出生 24

h 内的 Wistar 大鼠幼鼠 10 只(购自青岛市药检所,清洁级,动物合格证号:鲁动质字 D 200201 号)。

**1.1.3 骨片制备：**取新鲜牛股骨干皮质骨,锯成  $1\text{ cm} \times 1\text{ cm} \times 200\text{ }\mu\text{m}$  大小,再用油石磨成约  $30\text{ }\mu\text{m}$  厚的薄片,超声波清洗仪行超声清洗 3 次,每次 10 min,置于  $-70^\circ\text{C}$  冰箱保存。临用前以 75%酒精浸泡 24 h 后取出, D-hank's 缓冲液清洗 3 次,然后浸泡于  $\alpha$ -MEM 培养液中 10 min 后取出在超净台晾干,同时紫外灯照射 2 h。

**1.1.4 盖玻片处理：**用玻璃刀把盖玻片割成  $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$  大小,浓酸浸泡过夜,自来水冲洗 10 min,蒸馏水冲洗 3 min,然后浸泡于无水乙醇中 2 h 脱脂,用

镊子取出在超净台中晾干 ,用前高压灭菌。

### 1.2 实验分组

将培养的破骨细胞随机分为 A、B 两组 ,每组 24 个复孔 ,其中 14 孔预置盖玻片 ,另 10 孔预置骨片。A 组是直接分离培养的 OC ,B 组是  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  诱导培养的 OLC。

### 1.3 培养方法

**1.3.1 破骨细胞直接分离培养** 拉颈处死出生 24 h 内的 Wistar 大鼠 ,蒸馏水清洗 1 min 后 ,75% 乙醇浸泡 2 min ,分离股骨、胫骨和肱骨 ,仔细清除骨表面的软组织 ,剪除骨髓 ,骨干部分用  $\alpha$ -MEM 培养液洗 2 次 ,放入冷的  $\alpha$ -MEM 培养液内 ,用显微外科剪将骨干纵行剪开 ,用手术刀把骨髓腔内表面骨质轻轻刮入培养液内 ,再用圆头吸管轻轻吹打骨质碎片 2 min ,将附着于碎骨片上的破骨细胞冲入培养液内 ,静置 15 s ,吸取上层细胞悬液 ,制成细胞密度约为  $10^6$  个/ml 的细胞悬液 ,接种于预置盖玻片或骨片的 24 孔细胞培养板内 ,置  $\text{CO}_2$  培养箱(5%  $\text{CO}_2$  ,37℃)培养 30 min 后 ,吸出培养孔内的培养液除去未贴壁的杂细胞 ,用预温的  $\alpha$ -MEM 轻轻冲洗 2 次 ,更换新的培养液继续培养 ,每 48 h 换液 50%。

**1.3.2 破骨细胞诱导培养法** 4 周龄 Wistar 大鼠 ,蒸馏水冲洗鼠体后拉颈处死 ,75% 酒精浸泡 5 min ,取四肢置于冷 D-hank's 缓冲液(冰浴)中。用眼科器械分离出股骨、胫骨、肱骨和桡骨 ,仔细清除骨周围的软组织后 ,剪除骨髓 ,骨干部分用  $\alpha$ -MEM 培养液洗 2 次 ,再置于冷的  $\alpha$ -MEM 培养液中。用注射针头吸取  $\alpha$ -MEM 培养液轻轻冲洗骨髓腔 ,收集细胞混合液接种到细胞培养板(直径 3.5 cm) ,置  $\text{CO}_2$  培养箱(5%  $\text{CO}_2$  ,37℃)培养 30 min 后取出 ,收集培养板里的培养液(含骨髓单核细胞) ,800 r/min 4℃ 离心 8 min ,弃上清 ,沉淀用含  $10^{-8}$  mol/L  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$   $\alpha$ -MEM 培养液重悬后 ,调整细胞密度为  $2.5 \times 10^5$  /ml ,然后接种到 24 孔板上(预先已接种成骨细胞) ,置  $\text{CO}_2$  培养箱(5%  $\text{CO}_2$  ,37℃)培养 ,每 48 h 换液 50%。

### 1.4 破骨细胞形态观察

每天在倒置显微镜下对细胞进行活体观察 ,同时每个玻璃爬片随机取 5 个不同的 200 倍视野 ,计数不同时间多核细胞(3 个或 3 个以上)的总数作为每个玻片上该时间点破骨(样)细胞总数。

### 1.5 TRAP 染色

分别在直接分离培养的第 2、4、6、8 天 ,诱导培养的第 6、9、12、15 天取细胞玻璃爬片 ,根据试剂盒

说明进行 TRAP 染色。

### 1.6 扫描电镜标本的制备

把不同时间生长有破骨细胞的骨片以 0.25% 氢氧化铵超声处理 10 min ,清除骨片上的破骨细胞 ,然后以 2.5% 戊二醛固定 ,再经 1% 锇酸固定 ,酒精系列脱水 ,醋酸异戊酯置换酒精 ,二氧化碳临界点干燥 ,镀金 ,扫描电镜观察。对扫描电镜图像用 image-pro plus 5.0 图像分析软件分析骨吸收陷窝的数目和面积。

### 1.7 统计学处理

结果以  $\bar{x} \pm s$  表示 ,所有数据采用 SPSS 11.0 软件进行 ,多组比较用 one way ANOVA 方差分析 ,组间比较用  $q$  检验 ,两组比较用  $t$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 破骨细胞观察

**2.1.1 倒置显微镜下观察破骨细胞和计数** 直接分离培养的成熟 OC ,培养 30 min 后即可贴壁 ,可见胞体很大 ,轮廓清晰 ,呈煎油蛋型、漏斗型、哑铃型、菜刀型等 ,有大量伪足向四周伸展 ,细胞核很多 ,一般 8~15 个(图 1) ,到第 7 天个别破骨细胞出现胞体缩小 ,伪足消失 ,核固缩等凋亡现象 ,第 9 天破骨细胞数目明显减少。不同时间细胞计数结果见表 1。

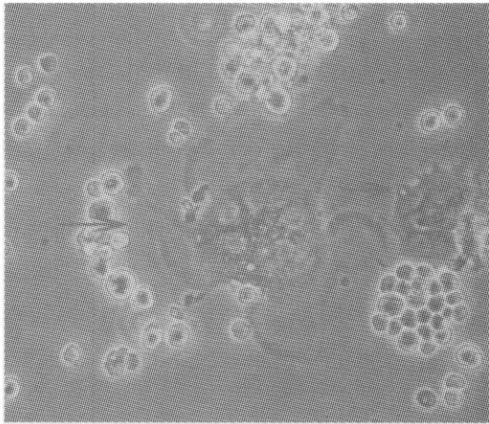


图 1 直接分离培养 30 min 获得的 OC ,箭头示两个 OC ,伪足向四周伸展 ,多核( $\times 200$ )

表 1 直接分离培养法多核细胞动态计数结果  
(个/片  $\bar{x} \pm s$ )

时间(天)	2	4	6	8	9
多核细胞个数	26.2 $\pm$ 4.4	25.4 $\pm$ 2.8	26.2 $\pm$ 2.7	23.6 $\pm$ 2.2	17.5 $\pm$ 2.6*

注 :与其他时间比较\*  $P < 0.05$

诱导培养的骨髓单核细胞 ,开始主要为单核圆形细胞 ,在培养的第 5 天才发现少数多核细胞 ,随培

养时间的延长逐渐增多。培养 9 天后 ,OLC 数量达最大值 ,胞体较大 ,呈不规则 ,边缘不整齐 ,有少量伪足 ,一般 3 ~ 8 个核(图 2)。第 13 天发现部分 OLC 出现胞体缩小 ,伪足消失 ,核固缩等凋亡现象 ,第 16 天破骨细胞数目明显减少。不同时间细胞计数结果见表 1。

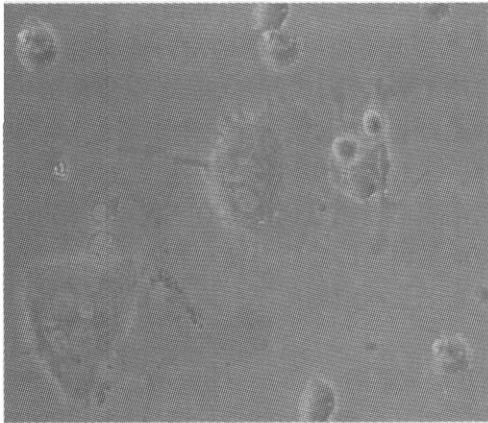


图 2 诱导培养第 7 天的 OLC,可见成骨细胞两侧各有一个多核 OLC,周围散布单核细胞(×200)

表 2 诱导培养法多核细胞动态计数结果(个/片  $\bar{x} \pm s$ )

时间(天)	6	9	12	15	16
多核细胞个数	13.5±2.4	38.4±3.1*	38.4±4.0*	31±2.4*	24.6±3.5**

注 :与第 6 天比较\*  $P<0.05$  ,与其他各时间比较\*\*  $P<0.05$

2.1.2 TRAP 染色结果 :TRAP 染色阳性多核细胞镜下胞浆酸性磷酸酶活性部位呈紫红色 ,细胞核染色阴性或淡染 ,伪足清晰(图 3)。

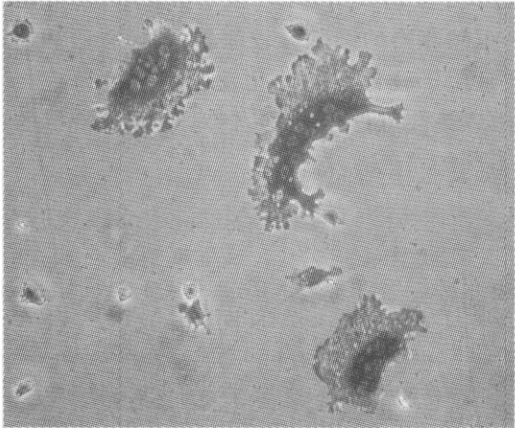


图 3 TRAP 染色阳性 OC,酶活性部位染成紫红色 ,核染色阴性或淡染 ,伪足明显(×200)

2.2 破骨细胞骨吸收功能观察

将 A 组所有骨片 ,于第 9 天取出在扫描电镜下观察 ,可见 OC 在骨片上形成骨陷窝 ,有的互相融合连成一片(图 4)。将 B 组所有骨片 ,于培养第 16 天

取出在扫描电镜下观察 ,可见 OLC 在骨片上形成的吸收陷窝较浅 ,面积也较小(图 5)。

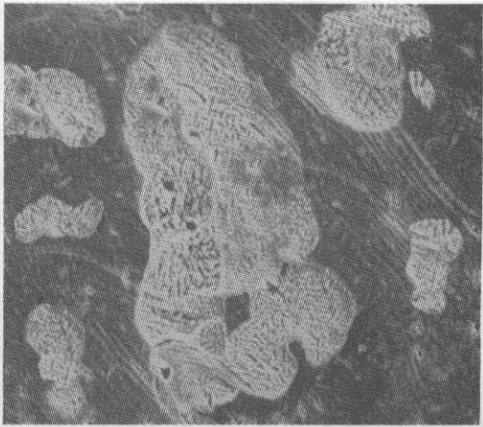


图 4 骨片与 A 组 OC 共培养的电镜图片(×200)

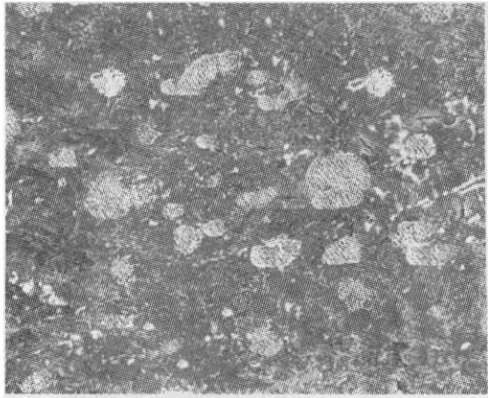


图 5 骨片与 B 组 OLC 共培养的电镜图片(×200)

高峰期间的破骨(样)细胞数目 A 组与 B 组比较差别有显著性意义( $P<0.05$ )。

表 3 骨片扫描电镜观察结果( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	骨陷凹数目(个/片)	骨陷凹面积( $\mu\text{m}^2$ /片)	骨陷凹平均面积( $\mu\text{m}^2$ /陷凹)
A	6	12.00±2.28*	313728.33±40972.86*	27386.50±8680.97*
B	6	21.83±1.94*	119322.50±13834.66*	5479.33±574.82*

注 :AB 两组间比较\*  $P<0.05$

3 讨论

OC 是骨的主要吸收细胞 ,参与体内的多种生理病理过程 ,如骨组织的修复改建 ,牙齿的萌出 ,乳恒牙的替换等。OC 体外培养是研究其生物学特性、骨吸收机制及其调控因素的重要前提。目前应用比较多的培养方法是机械分离直接培养法、骨髓或脾干细胞诱导培养法。

到目前为止 ,尚缺乏具有成熟 OC 特征的细胞

株,因此直接从骨组织中分离 OC 进行培养仍是获得成熟破骨细胞的最佳途径。从骨髓腔机械分离直接获得的 OC 是成熟的、分化完全的 OC,从本研究结果来看,这种 OC 骨吸收功能活跃。但是,由于正常幼鼠骨髓腔内本来存在的 OC 数量就有限;另外,与其他细胞相比,破骨细胞体积大,含丰富蛋白水解酶,还紧贴骨基质生长,这使得它们在分离过程中极易受到损伤,这就决定了这种方法获得的细胞数量较少,要想获得较纯的破骨细胞难度更大,尤其是生化和分子生物学研究所需要的大量高纯度破骨细胞更加困难。因此,我们认为该方法适用于骨吸收功能分析、破骨细胞迁移黏附、凋亡研究及单细胞分子生物学研究等,而不适用于细胞需要量较大的生化和分子生物学研究。

直接分离所获得的破骨细胞存活时间短,而且大部分是成熟破骨细胞,不利于观察各种因素对破骨细胞分化过程的影响。自 1981 年 Testa 等<sup>[1]</sup>首次在体外骨髓造血细胞培养时发现破骨细胞形成以来,骨髓源性细胞培养诱导分化破骨细胞的技术逐渐开展并得到应用。破骨细胞分化因子(osteoclast differentiation factor, ODF)和破骨细胞发生抑制因子(osteoclast cytogenesis inhibitory factor, OCIF)被证明是破骨细胞发生的关键细胞外调节因子,细胞在无诱导条件下以 OCIF 表达占优势,局部增加刺激因素可抑制 OCIF,促进 ODF 的表达,从而诱导 OC 的形成<sup>[2,3]</sup>。Suda<sup>[2]</sup>和 Horwood<sup>[4]</sup>研究证实:成骨细胞能表达 ODF,并在某些骨吸收刺激因子的作用下表达明显增强。而  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  被证明是一种很强的骨吸收刺激因子,是维生素 D 受体通路的代表因子,参与破骨细胞的形成及激活过程。目前国内所用的大鼠骨髓源性破骨细胞培养,主要以  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  作为诱导物<sup>[5,6]</sup>。本研究结果显示,诱导形成的 OLC 的破骨能力较直接分离培养的成熟 OC 弱。我们推测这是由于体内的 OC 前体细胞在分化发育过程中还同时受到其他激素和细胞因子(如:PTH、 $\text{PGE}_2$ 、 $\text{IL}_1$  和  $\text{IL}_6$  等<sup>[7]</sup>)的调控,在这种体液环境中分化成熟的破骨细胞功能活性可能比较健全。

由于骨髓干细胞  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  诱导培养体系需要成骨细胞支持,造成破骨细胞分离纯化困难,所以这种方法比较适用于研究破骨细胞分化发育过程中细胞因子的调节作用,而不适合用于对细胞纯度要求较高的破骨细胞分泌蛋白检测、生化和分子生物学研究等,国内于世风等<sup>[8]</sup>也做出了相似结论。关于

诱导形成的 OLC 的破骨功能还存在争议。本研究显示这种 OLC 能够形成骨陷凹,只是比直接机械分离培养的 OC 形成的单个骨陷凹的平均面积小,所以我们认为诱导形成的 OLC 有破骨能力,但较直接分离培养的成熟 OC 弱。

在细胞培养过程中我们有如下体会:①实验中我们发现如果将直接分离培养的破骨细胞在孵育 1 h 后,弃去原培养液并用新的培养液冲洗 2 次后,能有效排除成骨细胞、成纤维细胞等杂细胞的干扰,使真正的具有骨吸收功能的 OC 能够有足够伸展和移动空间。②对诱导法培养的细胞采取隔日换液一半的方法细胞活性明显优于隔日更换全部培养液的方法。可能是因为旧的培养液中含有上述有利于破骨细胞生长分化的细胞因子的缘故。

本研究尚有如下不足:虽然扫描电镜下能看到成熟 OC 形成的骨陷凹普遍比 OLC 形成的深,但由于没有找到一个很好的能够检测比较骨陷凹深度的方法,所以不能做统计学分析,假如能够解决这个问题,并且统计结果还有显著性意义的话,那将更加有力的证明本实验结论。

从本研究中我们可以做出如下结论:直接机械分离破骨细胞培养法不需特殊试剂和设备,操作较简单,成本低,也比较容易掌握,但是破骨细胞获得量较少,需要大批量处理动物,工作量较大;所获得的破骨细胞吸收功能活跃,适合骨吸收功能分析、破骨迁移黏附、凋亡研究及单细胞分子生物学研究。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  诱导培养法,操作较复杂,条件不容易掌握,虽然获得的细胞数较前者多,但骨吸收功能较弱,适合用于破骨细胞分化发育过程的研究。实验研究中应该注意这个差别,针对不同实验目的可以采用不同的培养方法。

## 【参 考 文 献】

- [1] Testa NG, Allen TD, Lajtha LG, et al. Generation of osteoclasts *in vitro*. J Cell Sci, 1981, 47: 127-137.
- [2] Suda T. How is bone formed and resorbed? —molecular mechanisms of bone formation and resorption. Rinsho Byori, 2002, 50: 267-272.
- [3] Tsukii K, Shima N, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor mediates an essential signal for bone resorption induced by  $1,25$ -dihydroxyvitamin  $\text{D}_3$ , prostaglandin  $\text{E}_2$ , or parathyroid hormone in the microenvironment of bone. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 246: 337-341.
- [4] Horwood NJ, Elliott J, Martin TJ, et al. Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. Endocrinology, 1998, 139: 4743-4746.

(下转第 601 页)

( 上接第 564 页 )

- [ 5 ] 刘波 ,于世凤 ,庞淑珍 . 高产量高纯度的破骨细胞分离培养 . 中国骨质疏松杂志 2004 ,4 :409-411 .
- [ 6 ] 杨旭 ,杨庆铭 ,邓廉夫 ,等 . 人成骨细胞与外周血单核细胞共同培养诱导破骨细胞核细胞 . 中国骨质疏松杂志 2003 ,1 :23-25 .
- [ 7 ] Yasuda H , Shima N , Nakagawa N , et al . A novel molecular

mechanism modulating osteoclast differentiation and function . Bone , 1999 ,25 :109-113 .

- [ 8 ] 李斌斌 ,于世凤 ,庞学珍 . 两种破骨细胞培养方法的比较及其吸收骨质的动态观察 . 北京大学学报( 医学版 ) ,2005 ,5 :536-541 .

( 收稿日期 :2006-05-10 )