

骨细胞的体外分离培养及鉴定

孙联文 杨肖 张恺 樊瑜波

中图分类号: Q2-33 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)09-0629-03

摘要:目的 建立较稳定的实验室骨细胞分离培养方法。方法 采用序列酶消化法,从3 d龄 Sprague-Dawley 乳鼠颅骨中分离骨细胞,通过形态学、改良钙钴法碱性磷酸酶(ALP)染色和免疫细胞化学法骨钙素(BGP)染色来鉴定骨细胞。结果 细胞形态呈星状、有树状突起,ALP染色阴性,BGP染色阳性,说明分离出的细胞为骨细胞。结论 本实验结果为在体外深入研究骨细胞的功能提供实验手段。

关键词: 骨细胞; 序列酶消化; 分离; 鉴定

DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2009.09.001

Isolation and identification of osteocytes in rats SUN Lianwen, YANG Xiao, ZHANG Kai, et al. School of Biological Science and Medical Engineering Beihang University, Beijing 100191, China

Abstract: Osteocytes are the most abundant cell type in bone. However, the function and the role in the mechanism of osteoporosis, especially of spaceflight-induced osteopenia, are unclear. This is impeded by the difficult accessibility of osteocytes *in vitro*. Therefore, it plays a key role in investigating osteocyte functions to isolate and culture osteocytes *in vitro*. Osteocytes were isolated from the calvaria tissue of 3-day-old rats using sequential collagenase digestion. The cells were identified as osteocytes through cell morphology, alkaline phosphatase (ALP) staining by Gomori and osteocalcin (BGP) staining by immunocytochemistry. The results showed that the cells appeared stellate with long protrusions. As expected, they are positive for BGP whereas negative for ALP. These characteristics are consistent with osteocytes and can be used to do further research.

Key words: Osteocytes; Sequential collagen digestion; Isolation; Identification

骨细胞是骨组织中数目最多的细胞,是早期感受力学刺激变化的敏感细胞之一^[1,2]。但由于其功能及特性仍然不十分清楚,且由于骨细胞的特殊位置,使可供在体外进行研究的成熟骨细胞的获得非常困难^[3]。目前,可供体外实验研究使用的骨细胞系较少,也尚未见稳定有效的分离骨细胞的方法。本研究利用序列酶消化法从3 d龄SD乳鼠颅骨中分离骨细胞,并结合碱性磷酸酶染色(alkaline phosphatase, ALP)和骨钙素(osteocalcin, BGP)染色对分离的细胞进行鉴定,建立起较为稳定的实验室骨细胞分离培养方法,为开展深入的实验研究提供手段。

1 材料和方法

1.1 实验动物

3 d龄 Sprague-Dawley 乳鼠,购自北京大学医学部实验动物中心。

1.2 主要试剂

DMEM/F-12(1:1)干粉培养基(Sigma公司);青霉素、链霉素、Triton X-100(Amresco公司);小牛血清CS(杭州四季青生物工程材料有限公司);胎牛血清FBS、小牛血清白蛋白BSA(北京元亨金马生物技术开发有限公司);I型胶原酶、胰蛋白酶(GIBCO公司);Rabbit Anti-BGP(博士德生物工程有限公司);碱性磷酸酶标记山羊抗兔IgG、DAB(A/B/C)(中杉金桥生物制品有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 骨细胞的序列消化分离、培养及传代:主要参考Gu等^[3]和Kato等^[4]的分离方法,经过改进,具

基金项目: 国家自然科学基金(10872024)

作者单位: 100191 北京,北京航空航天大学大学生物与医学工程学院

通讯作者: 樊瑜波, Email: yubofan@buaa.edu.cn

体分离、培养和传代步骤如下。(1)3 d 龄 SD 乳鼠 , 颈椎脱臼处死 , 浸入 75% 乙醇 3 ~ 5 s , 取出颅骨 (2) 70% 乙醇浸泡 10 ~ 15 s , PBS 洗 2 次 , 刮除表面骨膜 , 剪成 1 mm × 1 mm 骨片 (3) 加入 0.1% I 型胶原酶 , 37℃ 20 min , 吹打骨片 , 弃上清 (4) 重复步骤③ 3 次 (5) 加入含 0.1% BSA 的 5 mmol/L EDTA 37℃ 20 min (6) 吹打骨片 , 收集上清液 , 离心 200 g 5 min , 加入 1 ml 含 5% FBS 和 5% CS 的 DMEM , 备用 (7) 剩余骨片加入 I 型胶原酶溶液 37℃ 20 min , 重复步骤⑥ (8) 将剩余骨片再切成更小块 , 加入 EDTA 液 37℃ 20 min , 重复步骤⑥ (9) 剩余骨片再加入 I 型胶原酶溶液 37℃ 20 min , 重复步骤⑥ (10) 将 4 次所得 DMEM 细胞溶液混合 , 接种于 12 孔培养板 ; (11) 置于 5% CO₂、37℃ 培养 , 每 3 天换液 1 次 (12) 于第 7 ~ 10 天 , 用 0.25% 的胰蛋白酶溶液进行常规消化、传代 (13) 传代后第 3 天 , 染色 , 进行细胞鉴定。

1.3.2 骨细胞的鉴定 : 本实验将碱性磷酸酶(ALP) 染色和骨钙素(BGP) 染色相结合对骨细胞进行鉴定。并以成骨样细胞系 MC3T3-E1 作为对照组。

1.3.2.1 ALP 染色 : 采用改良的 Gomori 钙钴法 , 具体方法见表 1。

1.3.2.2 BGP 染色 : 采用免疫细胞化学法 , 一抗为兔抗骨钙素抗体(Rabbit Anti-BGP) , 二抗为碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG(Alkaline Phosphatase Goat

Anti-Rabbit IgG) , 严格按照 DAB 试剂盒操作 , 具体方法见表 2。

表 1 碱性磷酸酶(ALP) 染色步骤

序号	步骤
1	3%β-甘油磷酸钠 5 ml、2% 巴比妥钠 5 ml、2% CaCl ₂ 10 ml、2% MgSO ₄ 1 ml、蒸馏水 10 ml 充分混匀制成孵育液
2	吸弃培养液 , 蒸馏水快速冲洗数次 , 95% 乙醇固定 , 室温 10 min。蒸馏水洗 3 次 , 每次 1 min
3	加入孵育液 2 ml 37℃ 孵育 4 ~ 6 h , 蒸馏水洗 3 次 , 每次 5 min
4	加入 2% 硝酸钴 2 ml , 室温 5 min , 蒸馏水洗 3 次 , 每次 5 min
5	加入 1% 硫化铵 2 ml , 室温 5 min , 蒸馏水洗 3 次 , 每次 3 min
6	脱水、透明、封片 , 显微镜下观察并成像

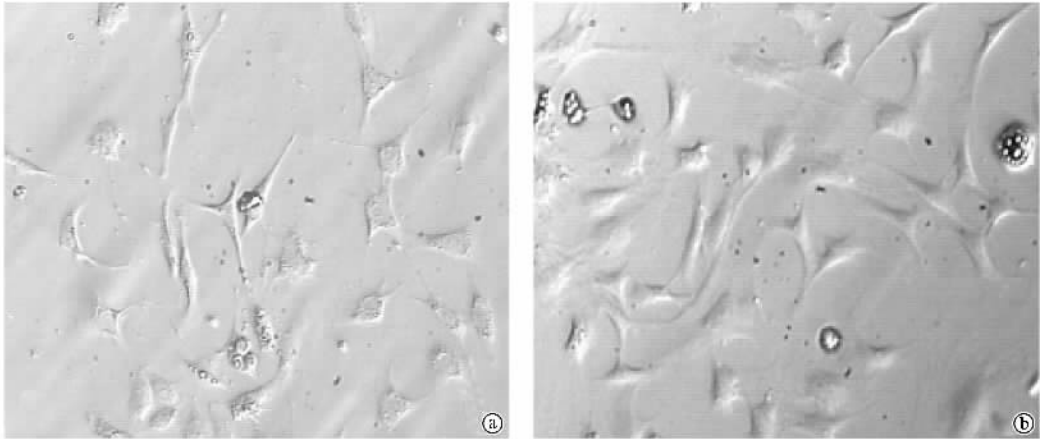
表 2 骨钙素(BGP) 染色步骤

序号	步骤
1	吸弃培养液 , PBS 快速冲洗数次 , 95% 乙醇固定 , 室温 30 min。蒸馏水洗 3 次 , 每次 5 min
2	加入 0.1% Triton 破膜 , 室温 10 min , PBS 洗 3 次
3	加入 1% BSA 封闭 , 室温 30 min
4	加入一抗(1:200) , 室温孵育 120 min , PBS 洗 3 次 , 每次 5 min
5	加入二抗(1:200) , 室温孵育 90 min , PBS 洗 3 次 , 每次 5 min
6	将 DAB 浓缩显色液稀释后 , 滴加显色 5 ~ 10 min , PBS 洗 3 次
7	脱水、透明、封片 , 显微镜下观察并成像

2 结果

2.1 细胞形态

60% 以上的细胞呈星形 , 有树枝状突起并与其他细胞相联系 (图 1、2) , 符合骨细胞的形态学特征 , 提示分离的细胞为骨细胞。少数细胞呈纤维状或长星型 , 可能为成骨细胞。



a : 原代第 2 天的细胞 ; b : 传代第 3 天的细胞

图 1 乳鼠颅骨分离出的骨细胞形态(× 20)

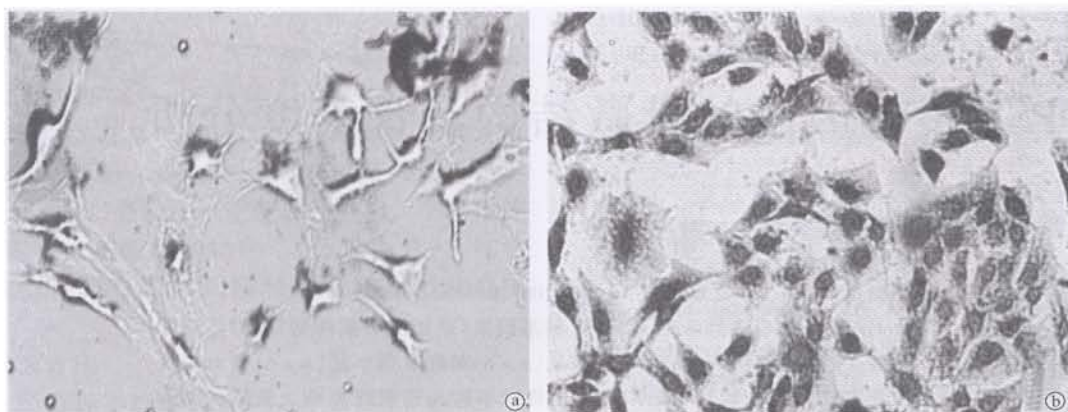
2.2 骨细胞的鉴定

ALP 染色结果显示 , 从乳鼠颅骨分离出的细胞未被染色 (图 2a) , 呈阴性反应 ; MC3T3-E1 被染成黑色 (图 2b) , 呈强阳性反应。

BGP 染色结果显示 , 从乳鼠颅骨分离出的细胞

被染成黄色 (图 3a) , 呈阳性反应 , 而 MC3T3-E1 未被染色 (图 3b) , 呈阴性反应。

两个染色实验结果显示 , 通过序列酶消化法从乳鼠颅骨分离出的多数细胞符合骨细胞的表现 , 即骨细胞能明确表达 BGP 而 ALP 染色阴性或仅弱阳



a: 分离出的细胞呈阴性反应; b: MC3T3-E1 呈阳性反应

图2 乳鼠颅骨细胞碱性磷酸酶染色结果($\times 20$)

a: 分离出的细胞呈阳性反应; b: MC3T3-E1 呈阴性反应

图3 乳鼠颅骨细胞骨钙素染色结果($\times 10$)

性^[1],说明分离出的细胞为骨细胞。

3 讨论

骨细胞是骨基质内唯一的细胞,也是骨组织中数目最多的细胞,大概是成骨细胞的10倍以上^[4],在骨生长和骨重塑过程中的组织适应上起重要作用。骨组织表层主要是成骨细胞,而骨片内层中骨细胞的数量远大于成骨细胞。本分离方法采用序列酶消化,随着消化次数的增多,获得的骨细胞纯度会越来越高,前4次消化下来的细胞主要是骨表面的成骨细胞,收集接下来的4次消化产物含有较多的骨细胞(50%以上),最后1次消化下来的骨细胞纯度可达80%左右。骨细胞从成骨细胞分化而来,但也可向成骨细胞转化,因此在体外分离出的骨细胞经过多次传代培养后,其纯度是增加或减少还有待进一步确定。

骨细胞与成骨细胞有许多相同的细胞标志物,不同的是所表达标志物的水平并不相同。比如骨细胞表达的ALP的水平远远低于成骨细胞,而其BGP的表达水平要高于成骨细胞。骨细胞是惟一能明确表达BGP而ALP染色阴性或仅弱阳性的细胞^[3]。本实验分离出的大多数细胞ALP染色呈阴性而

BGP染色呈阳性,符合骨细胞的特征。作为对照的成骨样细胞系MC3T3-E1,ALP染色呈强阳性,符合成骨细胞的特征,BGP染色呈阴性,支持Kato等^[4]的实验结果,但与Gu等^[3]的原代成骨细胞的实验结果相反,这可能主要是由于细胞来源不同所致。

总之,利用序列酶消化法可从乳鼠颅骨分离出骨细胞,可用于研究骨细胞对力学刺激的反应。然而,原代分离出的细胞数量有限,如能在国内建立起类似MLO-Y4的骨细胞系,将更有利于体外实验研究的广泛展开。另外,空间飞行中承重骨骨量的丢失比较明显^[5],提示从下肢承重骨中分离、建立骨细胞系进行力生物学研究似乎更为合理。

【参考文献】

- [1] Westbroek I, Ajubi NE, Alblas MJ, et al. Differential stimulation of prostaglandin G/H synthase-2 in osteocytes and other osteogenic cells by pulsating fluid flow. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 268(2): 414-419.
- [2] McGarry JG, Klein-Nulend J, Prendergast PJ. The effect of cytoskeletal disruption on pulsatile fluid flow-induced nitric oxide and prostaglandin E₂ release in osteocytes and osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 330(1): 341-348.
- [3] Gu Guoliang, Martin Nars, Teuvo A. Hentunen. Isolated primary osteocytes express functional gap junctions *in vitro*. *Cell Tissue Res*, 2006, 323(2): 263-271.
- [4] Kato Yoichi, Jolene J. Windle, et al. Establishment of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4. *J Bone Miner Res*, 1997, 12(12): 2014-2023.
- [5] Vico L, Collet P, Guisnandon A, et al. Effects of long-term microgravity exposure on cancellous and cortical weight-bearing bones of cosmonauts. *Lancet*, 2000, 355(6): 1607-1611.

(收稿日期: 2009-02-28)