

M-CSF 和 RANKL 体外诱导培养小鼠破骨样细胞及其骨吸收功能的动态观察

孙继蒂 沈铁城 黄永辉 江红卫

中图分类号: R318 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2011)05-0378-04

摘要: 目的 以巨噬细胞集落刺激因子(Macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)和核因子 κ B受体激动剂配体(Ligand of receptor activator of NF- κ B, RANKL)联合体外诱导小鼠骨髓干细胞分化为破骨样细胞,并对其骨吸收功能进行动态观察。方法 分离小鼠四肢骨获取骨髓干细胞,以 M-CSF 和 RANKL 诱导培养,将盖玻片及骨磨片置入培养基内,在诱导培养的第 3、6、9 天分别对盖玻片行抗酒石酸酸性磷酸酶(The tartrate-resistant acid phosphatase TRAP)染色,观察细胞形态和染色情况,并计算破骨样细胞数量;同时对骨磨片进行骨吸收陷窝的观察。结果 诱导培养 3 d 后出现含 TRAP(+)颗粒的细胞,可见淡染单核和双核;诱导培养 6 d 后可见 TRAP(+)细胞较诱导培养 3 d 时增多,仍以双核为主;诱导培养 9 d 后出现多核巨型 TRAP(+)细胞,细胞核达到 3 个以上。并且随着诱导培养的时间延长,破骨样细胞数量逐渐增长。诱导培养第 3、6 天骨磨片上均未发现骨吸收陷窝,第九天出现不同形态的呈蓝紫色的吸收陷窝。结论 M-CSF 和 RANKL 联合体外诱导小鼠骨髓干细胞形成破骨样细胞是一种有效的诱导培养方法,本实验在诱导培养第九天发现破骨样细胞具有骨吸收功能。

关键词: M-CSF; RANKL; 破骨细胞; 细胞培养

Dynamic observation of the culture and bone resorption function of osteoclast-like cells induced by M-CSF and RANKL in vitro SUN Jifu, SHEN Tiecheng, HUANG Yonghui, et al. Department of Orthopedics, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China

Corresponding author: SUN Jifu, Email: sjf519@yahoo.com.cn

Abstract: Objective Mouse bone marrow stem cells were induced to osteoclasts using both macrophage colony-stimulating factor(M-CSF) and receptor activator of NF- κ B ligand(RANKL) in vitro. The bone absorption function was observed dynamically. **Methods** Bone marrow stem cells obtained from mouse extremities were isolated and cultured with M-CSF and RANKL. The coverslips and bone slices were put in the cultures. The tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP) staining was performed to observe cell morphology and staining. The absorption lacuna in bone slices were observed meanwhile. **Results** TRAP-positive cells with light stained mononucleus or double nucleus appeared after a 3-day culture. TRAP-positive cells became more after 6-day culturing than after 3-day culturing, and the cells were mainly double nucleated. TRAP-positive multinuclear cells appeared after 9-day culturing, and the cells had more than three nuclei. The absorption lacuna in bone slices were not found after 3-day and 6-day culturing. The blue to purple absorption lacuna appeared with different shape after a 9-day culturing. **Conclusion** Utilizing M-CSF and RANKL to induce bone marrow stem cells to osteoclasts was an effective culture method. The osteoclast-like cells were found to have bone resorption function after a 9-day induced culturing in this experiment.

Key words: M-CSF; RANKL; Osteoclasts; Cell culture

破骨细胞是具有骨吸收功能的多核巨细胞。它

是高代谢的分化终末细胞,体内数量较少,分离纯化困难,且不能分化传代,这些特点阻碍了人们对其分子生物学特性等方面的进一步研究。因此近年来,如何获得大量高纯度的破骨细胞,一直成为研究破

作者单位: 212001 江苏省镇江市,江苏大学附属医院

通讯作者: 孙继蒂, Email: sjf519@yahoo.com.cn

骨细胞的热点和难点。

破骨细胞来源于造血前体细胞的单核/巨噬系统^[1,2]。造血前体细胞的单核系祖细胞在体内分化为破骨细胞主要依靠两种细胞因子的表达:一个是巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF),另一个是核因子 κ B受体激动剂配体(RANKL)^[3,6]。有研究表明,M-CSF和RANKL这两种细胞因子可协同诱导骨髓干细胞形成破骨样细胞,但其诱导方法的重复性及诱导出的破骨样细胞的是否具有骨吸收功能尚有疑问^[7,8]。因此,本实验希望用M-CSF和RANKL体外诱导出破骨样细胞,并对其骨吸收功能进行动态观察。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和试剂:5~8周龄ICR小鼠,murine M-CSF, murine RANKL(英国Peprotech公司),M199培养基(美国Gibco公司),胎牛血清,HEPES,谷氨酰胺,青霉素,链霉素(美国Sigma公司),TRAP染色试剂盒(美国Sigma公司,编号387-A)。

1.1.2 实验器材:CO₂培养箱(德国Heraeus B5060 EK-CO₂),24孔培养板(美国Gibco公司),JD801图像分析软件系统,锯式切片机(Leitz1600,德国生产)。

1.1.3 骨磨片的制备:取新鲜牛股骨干致密骨,以锯式切片机横切成厚50 μ m,5mm $\times$ 5mm大小的骨磨片,在超声波清洗仪内超声清洗10min,3次;然后浸泡于抗生素(青霉素1000 U/ml,链霉素1000 mg/L)内30 min,3次。

1.2 方法

1.2.1 骨髓干细胞诱导形成破骨样细胞:参考Karen Fuller^[9]的培养方法,取5~8周龄ICR小鼠,拉颈处死,75%酒精消毒,无菌条件下于冰板上分离小鼠的四肢骨,在D-HANKS液中将骨髓及表面软组织去除干净,再用M199冲洗骨髓腔直至其内面白,冲洗后的细胞悬液用21号注射针头反复抽吸,以获得单细胞悬液。将获得的骨髓细胞用M199(含10%FBS)重悬两次,调整细胞密度为 3×10^6 个/ml,在含有5ng/ml M-CSF的培养皿中培养24h,收集未贴壁细胞,即得小鼠骨髓干细胞,调整接种细胞密度 10^5 /ml,加入放有盖玻片及骨磨片的24孔培养板培养,同时加入M-CSF 10ng/ml及RANKL 100ng/ml。每3天半量换液,培养3,6,9 d后分别

将6片盖玻片进行抗酒石酸性磷酸酶(TRAP)染色,观察细胞形态及TRAP染色情况,计算比较破骨样细胞数量。并在诱导培养3,6,9 d时,分别取出骨磨片行甲苯胺蓝染色,通过观察骨磨片上的骨吸收陷窝,比较不同时期的破骨样细胞的骨吸收功能。

1.2.2 抗酒石酸性磷酸酶(TRAP)染色^[10]:取盖玻片,2.5%戊二醛中4 $^{\circ}$ C固定7 min,蒸馏水漂洗3遍。取0.125ml 1%甲苯胺蓝GBC溶液和0.125ml 1%亚硝酸银溶液,轻轻混匀30 s,静止2min。取事先预热的11.25ml三蒸水,将第二步制得的混合液加入,并分别依次加入下列物质:0.125ml 1%萘酚AS-BI磷酸盐溶液,0.5ml 1%醋酸溶液,0.25ml 1%酒石酸溶液。制得染色液。将盖玻片放入染色液中,37 $^{\circ}$ C孵育1 h。三蒸水冲洗3遍,光镜下观察。

1.2.3 骨吸收陷窝光镜观察:将骨磨片取出,2.5%戊二醛4 $^{\circ}$ C固定7min,在0.25mol/L氢氧化钡中以50kHz超声清洗5min,系列酒精脱水,自然晾干,1%甲苯胺蓝室温染色5min,蒸馏水冲洗后分别将骨磨片置于光镜下观察,比较骨磨片上吸收陷窝的变化。

2 结果

2.1 抗酒石酸性磷酸酶(TRAP)染色观察

M-CSF,RANKL联合诱导骨髓干细胞培养3,6,9 d后将盖玻片取出行TRAP染色。诱导培养3 d后可见少量活性良好的破骨样细胞,胞质内可见透亮区,且胞质内含许多红色阳性颗粒,此为TRAP染色(+)颗粒,细胞内可见淡染的双核。诱导培养6 d后可见大量TRAP染色(+)破骨样细胞,此时细胞核仍以双核为主。诱导培养9 d出现多核巨型TRAP染色(+)破骨样细胞,细胞较第3,6天明显增大,细胞核可达到3个以上(图1~3)。

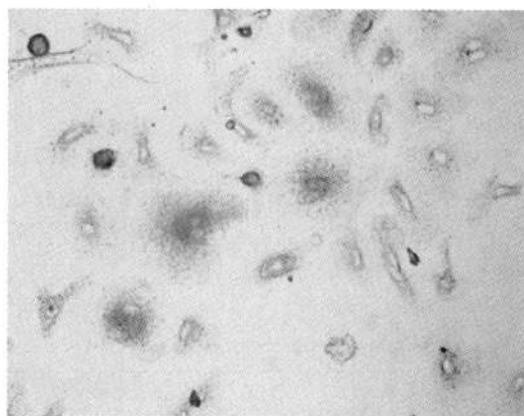


图1 M-CSF,RANKL联合诱导培养3 d后出现含TRAP(+)颗粒的细胞,可见淡染的单核和双核(400 $\times$)

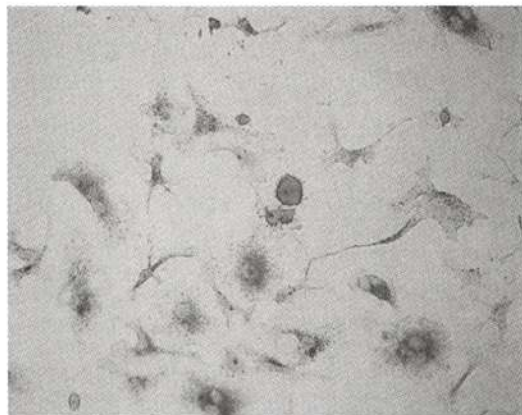


图2 M-CSF,RANKL联合诱导培养6 d后可见TRAP(+)细胞较诱导培养3 d时增多,仍以双核为主(400×)

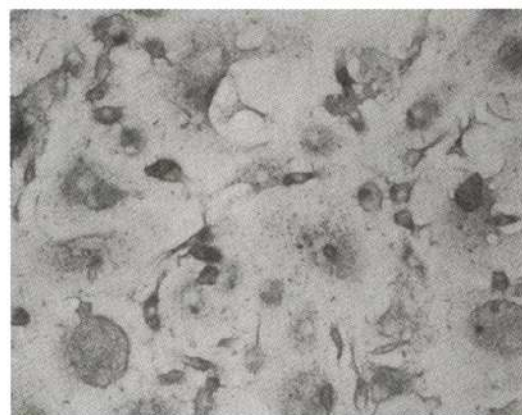


图3 M-CSF,RANKL联合诱导培养9 d后出现多核巨型TRAP(+)细胞,细胞核达到3个以上(400×)

2.2 培养不同天数时破骨样细胞数量的比较

M-CSF,RANKL联合诱导骨髓干细胞培养3,6,9 d后分别将6片盖玻片取出,在光镜(400×)下行破骨样细胞计数。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所测数据采用SPSS13.0软件包行单因素方差分析比较所有组间差异,然后用 q 检验进行各组间两两比较。检验水准为: $\alpha=0.05$ 。

表1的统计分析提示:M-CSF,RANKL联合诱导骨髓干细胞培养3,6,9 d后,破骨样细胞数量逐渐增长($9d > 6d > 3d$),3组细胞数量比较有统计学差异($P > 0.05$)。

表1 M-CSF,RANKL联合诱导培养不同天数时破骨样细胞数量的比较($\bar{x} \pm s$)

项目	M-CSF,RANKL诱导培养天数		
	3d	6d	9d
破骨样细胞数量(个)	35.8 ± 7.6	65.1 ± 3.7	113.3 ± 4.8

万方数据

2.3 吸收陷窝动态观察

在诱导培养3,6,9 d时,分别取出4片骨磨片行甲苯胺蓝染色,我们发现第3天及第6天未出现骨吸收陷窝,而第9天可见不同形态的呈蓝紫色的吸收陷窝,有的呈圆形或椭圆形,有的吸收陷窝连接成片状或串状(图4,5)。

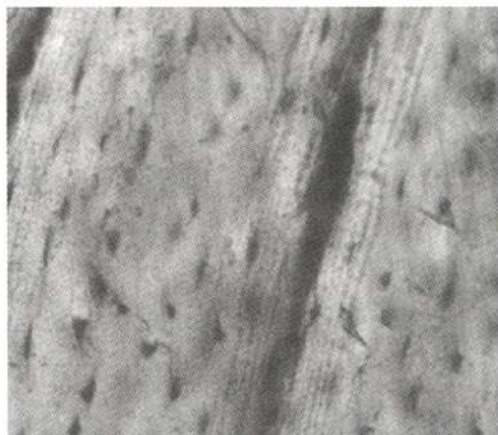


图4 第3天骨磨片上未出现明显的吸收陷窝(200×)



图5 第6天骨磨片上仍未出现明显的吸收陷窝(200×)



图6 第9天骨磨片上出现呈蓝紫色的吸收陷窝(200×)

3 讨论

破骨细胞是一种终末分化细胞,不能传代和增殖,体外培养困难。目前,体外分离培养破骨细胞的基本方法有机械分离法、凝胶纯化法和诱导培养法 3 种。机械分离法和凝胶纯化法只能得到极少量的破骨细胞,且分离后的破骨细胞无法增殖和传代,根本无法满足其分子生物学等方面的研究。而体外诱导培养随着培养技术不断改进,产量和纯度都比其他培养法有很大提高,有利于人们对破骨细胞分化成熟过程中调控机理的研究,从而为相关临床疾病如骨质疏松等的治疗提供实验基础^[11]。

体外诱导培养破骨细胞有很多方法,而 M-CSF/RANKL 两种细胞因子协同诱导骨髓干细胞形成破骨细胞是一种较新的破骨细胞诱导培养法^[12]。Theill LE 等^[13]发现 M-CSF 是破骨细胞前体细胞形成和增殖的必需因子,同时也证明 RANKL,也称 ODF(osteoclast differentiation factor),能介导破骨细胞前体细胞的融合,并用 M-CSF 和 RANKL 联合诱导培养出高浓度高纯度的破骨细胞。Teitelbaum SL^[14]也证实 M-CSF 可刺激骨髓干细胞向单核/巨噬细胞系分化,利于破骨细胞前体细胞的增殖并促进已分化的破骨细胞存活;RANKL 由成骨/基质细胞分泌,是成骨细胞—破骨细胞膜之间信息传导的启动蛋白,目前已知的唯一能够直接作用于前破骨细胞诱导其分化、成熟并激活其骨吸收活性的细胞因子。另外由于破骨细胞起源于骨髓造血干细胞中的单核细胞前体细胞并由前体破骨细胞融合而成,且骨髓细胞取材相对容易,所以 M-CSF 与 RANKL 协同诱导骨髓干细胞形成破骨细胞的培养方法得到广泛应用,但诱导出的破骨样细胞有无成熟破骨细胞的骨吸收功能以及何时具备骨吸收功能尚有争议。

本实验以 M-CSF(10 μ g/L)和 RANKL(100 μ g/L)诱导小鼠骨髓干细胞向破骨样细胞分化,在诱导过程中的不同时段,对破骨样细胞进行染色,并对骨磨片进行观察。实验发现:随着诱导培养的时间延长,破骨样细胞数量逐渐增长,实验的第 3 天和第 6 天骨磨片上未发现吸收陷窝,而第 9 天骨磨片上出现呈蓝紫色的吸收陷窝,也正是第 9 天 TRAP 染色后发现多核巨型 TRAP(+)细胞,这提示以 M-CSF 和 RANKL 诱导破骨样细胞的分化过程中,只有经过较长时间才能诱导出 TRAP 染色(+)的具有骨吸收功能的破骨样细胞。本实验仅从破骨样细胞的

形态、数量和功能变化方面进行观察对比研究,至于其诱导分化过程中的分子生物学机制还有待进一步研究。

综上所述,本实验证明以 M-CSF 和 RANKL 协同诱导小鼠骨髓干细胞形成破骨样细胞是一种较成熟的诱导培养方法,其重复性好,可以获得大量高纯度的 TRAP(+)破骨样细胞,但只有在诱导培养达到一定时间后(本实验为 9 d),此种细胞才具有骨吸收功能。因此,在用 M-CSF 和 RANKL 诱导出的破骨样细胞进行骨吸收作用及其调控机理等方面的研究时,应对其诱导成熟的时间有所预见。

【参考文献】

- [1] Zaidi M. Skeletal remodeling in health and disease. *Nat Med*, 2007,13(7):791-801.
- [2] Mundy GR. Osteoporosis and inflammation. *Nutr Rev*, 2007, 65 (12 Pt 2):S147-S151.
- [3] Loser K, Mehling A, Loeser S, et al. Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells. *Nat Med*, 2006,12(12):1372-1379.
- [4] Crotti TN, Flannery M, Walsh NC, et al. NFATc1 regulation of the human beta3 integrin promoter in osteoclast differentiation. *Gene*, 2006,372:92-102.
- [5] Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, et al. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature*, 1990, 345(6274):442-444.
- [6] Roodman GD. Regulation of osteoclast differentiation. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1068:100-109.
- [7] Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone*, 2007, 40(2):251-264.
- [8] Bab I, Zimmer A. Cannabinoid receptors and the regulation of bone mass. *Br J Pharmacol*, 2008, 153(2):182-188.
- [9] Fuller K, Wong B, For S, et al. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med*, 1998, 188:997-1001.
- [10] Tsuchiya T, Matsumoto Y, Kurihara S. The fluorescent simultaneous azo dye technique for demonstration of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity in osteoclast-like multinucleate cells. *J Bone Miner Metab*, 1995, 13:71-76.
- [11] 张鲲,陈晓亮,王德春,等.两种方法培养大鼠破骨细胞的比较研究. *中国骨质疏松杂志*,2006,12(6):561-564,601.
- [12] 王斌,吴小涛.破骨细胞的分化及其调节研究进展. *中国骨质疏松杂志*,2007,13(8):600-603.
- [13] Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol*, 2002,20:795-823.
- [14] Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*,2000, 289:1504-1508.

(收稿日期:2010-11-20)

M-CSF和RANKL体外诱导培养小鼠破骨样细胞及其骨吸收功能的动态观察



作者：孙继苗， 沈铁城， 黄永辉， 江红卫
作者单位：江苏大学附属医院, 江苏省镇江市, 212001
刊名：中国骨质疏松杂志 
英文刊名：CHINESE JOURNAL OF OSTEOPOROSIS
年，卷(期)：2011, 17(5)

参考文献(14条)

1. Teitelbaum SL Bone resorption by osteoclasts[外文期刊] 2000

2. Theill LE;Boyle WJ;Penninger JM RANK-L and RANK:T cells,bone loss,and mammalian evolution 2002

3. 王斌;吴小涛 破骨细胞的分化及其调节研究进展 2007(08)

4. 张鲲;陈晓亮;王德春 两种方法培养大鼠破骨细胞的比较研究 2006(06)

5. Tsuchiya T;Matsumoto Y;Kurihara S The fluorescent simultaneous azo dye technique for demonstration of tartrateresistant acid phosphatase (TRAP) activity in osteoclast-like multinucleate cells[外文期刊] 1995

6. Fuller K;Wong B;For S TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts[外文期刊] 1998

7. Bab I;Zimmer A Cannabinoid receptors and the regulation of bone mass[外文期刊] 2008(02)

8. Asagiri M;Takayanagi H The molecular understanding of osteoclast differentiation[外文期刊] 2007(02)

9. Roodman GD Regulation of osteoclast differentiation[外文期刊] 2006

10. Yoshida H;Hayashi S;Kunisada T The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene[外文期刊] 1990(6274)

11. Crotti TN;Flannery M;Walsh NC NFATc1 regulation of the human beta3 integrin promoter in osteoclast differentiation[外文期刊] 2006

12. Loser K;Mehling A;Loeser S Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells 2006(12)

13. Mundy GR Osteoporosis and inflammation 2007(12 Pt 2)

14. Zaidi M Skeletal remodeling in health and disease[外文期刊] 2007(07)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201105002.aspx