

[文章编号] 1000-1182(2006)04-0350-03

# 胰酶消化法纯化诱导不同年龄段SD大鼠 骨髓破骨细胞的体外培养

董强<sup>1</sup>, 梁星<sup>2</sup>, 陈悦<sup>2</sup>, 徐凌<sup>1</sup>, 张庆鸿<sup>1</sup>, 夏露<sup>1</sup>, 陈明<sup>1</sup>, 付俊<sup>1</sup>

(1.口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川大学; 2.四川大学华西口腔医院 修复科, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 用胰酶消化法纯化获取大量高纯度破骨细胞, 为进行相关分子生物学研究奠定基础。方法 以1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>/地塞米松诱导培养不同年龄段 1、12、24、36 d SD大鼠的骨髓破骨细胞, 采用0.25%胰蛋白酶/0.02%乙二胺四乙酸纯化。通过倒置相差显微镜观察细胞形态, 采用抗酒石酸酸性磷酸酶(Trap)染色和扫描电镜观察鉴定破骨细胞, 并计数分析。结果 1、12、24、36 d组大鼠骨髓破骨细胞均培养成功, 经Trap染色和扫描电镜观察证实为体外有噬骨能力的破骨细胞, 纯化率达到90%。1 d和12 d组破骨细胞出现较早且数量较多, 细胞计数两组间无统计学差异(P>0.05), 但它们与其余各组均有统计学差异(P<0.05)。结论 采用胰酶消化法纯化1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>/地塞米松诱导培养的大鼠骨髓破骨细胞, 纯度较高; 选用大鼠以10—12 d龄较为适宜。

[关键词] 破骨细胞; 胰酶消化; 培养; 纯化

[中图分类号] R783.1 [文献标识码] A

Isolation of Bone Marrow-derived Rat Osteoclast-like Cells with the Digestion of Trypsin DONG Qiang<sup>1</sup>, LIANG Xing<sup>2</sup>, CHEN Yue<sup>2</sup>, XU Ling<sup>1</sup>, ZHANG Qing-hong<sup>1</sup>, XIA Lu<sup>1</sup>, CHEN Ming<sup>1</sup>, FU Jun<sup>1</sup>. (1. Key. Laboratory of Oral Biomedical Engineering Ministry of Education, Schuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Prosthodontics, West China College of Stomatology, Schuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Objective To obtain highly enriched osteoclasts in vitro. Methods The bone marrow cells of 1-day, 12-day, 24-day and 36-day old Sprague-Dawley (SD) rats were separately cultured with the presence of 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and dexamethasone, and the osteoclast-like cells were identified by Trap staining and scanning electron microscope observation and were purified by trypsin digestion. The count of Trap positive osteoclast-like cells was analyzed statistically. Results The osteoclast-like cells of each group were Trap positive cells and could form the bone absorption lacunas in vitro. The amounts of osteoclast-like cells were different statistically between the groups (P<0.05) except between the groups of 1-day old and 12-day old (P>0.05). Highly enriched osteoclast-like cells were harvested by the digestion of 0.25% trypsin and 0.02% EDTA. Conclusion It is indicated that a large amount of highly enriched osteoclast-like cells could be obtained through the culture of bone marrow cells of 10-day and 12-day old SD rats with 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and dexamethasone and the digestion of trypsin/EDTA.

[Key words] osteoclast; trypsin digestion; culture; purify

破骨细胞作为惟一具有骨吸收功能的细胞, 参与牙萌出、骨质疏松、牙周炎、种植体周围炎、骨折愈合等生理病理过程, 在骨组织生长改建中发挥重要作用。破骨细胞体外培养是研究其生物学特性和骨吸收调控机制的重要手段, 但由于破骨细胞是

终末分化细胞, 组织含量少且很脆弱<sup>[1]</sup>, 目前体外培养尚无法传代, 纯化困难。如何获取大量高纯度破骨细胞, 是破骨细胞体外培养研究的难点和热点。目前体外获取破骨细胞的方法主要有机械分离法和骨髓诱导培养法, 而纯化方法主要是针对机械分离法获取的成熟破骨细胞, 对骨髓诱导培养法获取的破骨细胞进行纯化的方法尚不多见。本研究采用地塞米松结合经典的维生素D<sub>3</sub>[1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>]进行骨髓诱导培养, 获得破骨细胞, 并用胰酶消化法纯化, 探讨获取高产量高纯度破骨细胞的体外培养方法。

[收稿日期] 2005-10-20; [修回日期] 2006-02-23

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30271428); 教育部“优秀青年教师资助计划”资助项目[教人司(2002)40号]; 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(B1200058)

[作者简介] 董强(1975-), 男, 山东人, 主治医师, 博士, 现在贵州医学院附属医院口腔科工作

[通讯作者] 梁星, Tel: 028-85503570

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物和分组 出生1、12、24和36 d的雄性SD大鼠各6只,共24只 四川大学华西动物实验中心提供,按天龄分别分为A、B、C、D组。

1.1.2 试剂和仪器 -MEM培养基 Gibco公司,美国),胎牛血清 Hyclone公司,美国), $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、地塞米松、胰蛋白酶、乙二胺四乙酸 ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)(Sigma公司,美国), $\text{CO}_2$ 恒温培养箱 Sanyo公司,日本),倒置相差显微镜 (Olympus公司,日本)。

### 1.2 方法

1.2.1 薄牙片的制备 将人离体恒磨牙横切成薄片,约 $10\text{ mm}\times 6\text{ mm}\times 2\text{ mm}$ 大小,金刚砂纸磨至 $50\text{--}100\text{ }\mu\text{m}$ ,超声清洗3次,每次5 min。置于D-Hank's液(含青霉素 $1\text{ }000\text{ U/mL}$ ,链霉素 $1\text{ }000\text{ }\mu\text{g/mL}$ )中过夜,4℃保存。使用前浸泡于新鲜配制的-MEM培养基中20 min,然后置入6孔板内。

1.2.2 破骨细胞原代培养和纯化 将4组大鼠用引颈法处死,无菌条件下取四肢长骨,去净骨表面软组织,暴露髓腔,一次性注射器吸取-MEM全培养基-MEM培养基加入15%胎牛血清、 $100\text{ U/mL}$ 青霉素、 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 链霉素、 $1\times 10^{-7}\text{ mol/L}$ 的 $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ 和 $1\times 10^{-8}\text{ mol/L}$ 的地塞米松,冲洗髓腔至髓腔发白,吹打细胞。将细胞悬液以每毫升 $10^7$ 个细胞的密度接种于6孔板内(其中2孔加入薄牙片),加入-MEM全培养基,37℃、5% $\text{CO}_2$ 孵箱内培养,每3天更换1次培养液。细胞培养第7天,用0.25%胰蛋白酶/0.02% EDTA消化6—8 min,-MEM全培养基终止胰酶作用。

1.2.3 破骨细胞的观察、鉴定和计数分析 倒置相差显微镜观察:将培养细胞直接置于倒置显微镜下,观察细胞生长情况,每日观察1次。培养第7天,将细胞经胰酶消化后进行抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, Trap)染色,观察破骨细胞的生长分化情况。Trap染色时,将细胞用2.5%戊二醛4℃固定10 min,冲洗后置入Trap孵育液(A液为 $0.1\text{ mol/L}$ 乙酸缓冲液,B液为六偶氮副品红液,C液为萘酚AS-BI磷酸盐),37℃孵育50 min,然后置于倒置显微镜下观察,胞浆呈红色为染色阳性。扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)观察:培养第7天,将6孔板内的薄牙片用2.5%戊二醛固定10 min,一半牙片进行超声清洗,另一半为观察破骨细胞不经超声清洗。所有牙片经梯度酒精脱水,醋酸异戊酯置换, $\text{CO}_2$ 临界点干燥

和镀金后,在扫描电镜下观察牙片上的吸收陷窝。

破骨细胞计数分析:培养第7天,进行Trap染色,置于倒置显微镜下( $\times 100$ )观察,细胞核超过3个的细胞计为Trap阳性多核细胞。每孔随机取6个视野,计数Trap阳性多核细胞,取均数作为该孔的破骨细胞数(个/孔),每组6孔。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS11.0统计软件对破骨细胞计数结果进行单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 倒置显微镜观察结果

破骨细胞培养第1天,大量骨髓单核细胞均匀分布于6孔板内。随时间推移,可见多个单核细胞团聚,细胞间隔逐渐模糊,最终融合成一个多核大细胞。培养第3、4天,A、B组出现多核细胞;第5天,C、D组出现多核细胞;第8、9天,4组的多核破骨样细胞数量均达高峰,呈煎蛋形、漏斗形等不规则形态,有伪足和丝状突起,可含十几个细胞核,核在细胞内分布无规律。培养第7天加入0.25%胰蛋白酶/0.02% EDTA消化后,6孔板内大部分单核细胞脱落,可见纯化的多核破骨样细胞(图1),纯化率达90%。Trap染色阳性的多核破骨样细胞如图2所示,可见细胞胞浆呈红色阳性反应,胞核阴性。

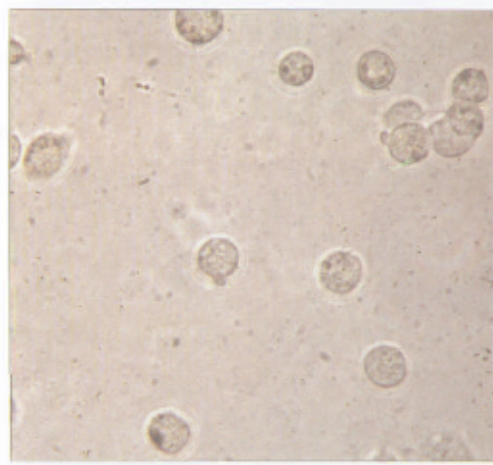


图1 纯化的多核破骨样细胞 倒置显微镜  $\times 200$

Fig 1 The purified multinucleated osteoclast-like cells inverted microscope  $\times 200$

### 2.2 扫描电镜观察结果

扫描电镜观察经超声清洗的牙片表面,可见吸收陷窝呈圆形、椭圆形或不规则形,边界清晰,底面粗糙,有纤维样基底(图3);未经超声清洗的牙片表面,可见吸收陷窝内有与倒置显微镜下相似的破骨样细胞,呈煎蛋样等不规则形态,细胞表面有伪足样突起(图4)。

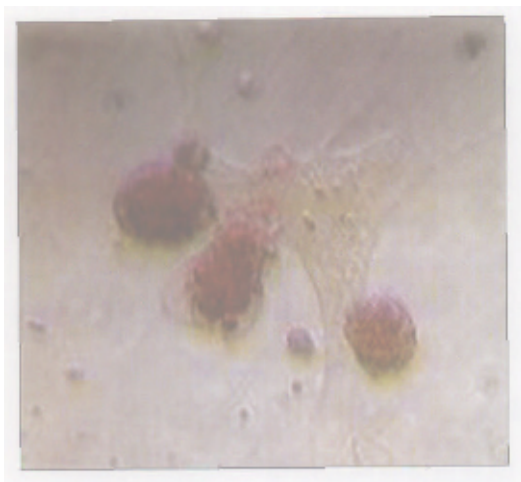


图 2 Trap染色阳性的多核破骨样细胞 Trap染色 ×400  
Fig 2 The red multinucleated cells are positive cells Trap staining ×400

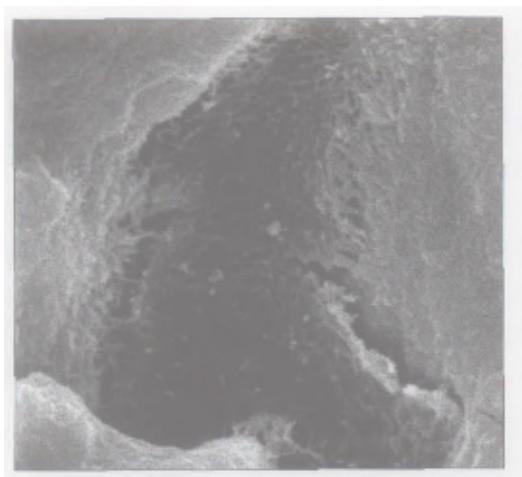


图 3 牙片表面的吸收陷窝 SEM ×4 000  
Fig 3 The lacuna resorption on dental slice SEM ×4 000

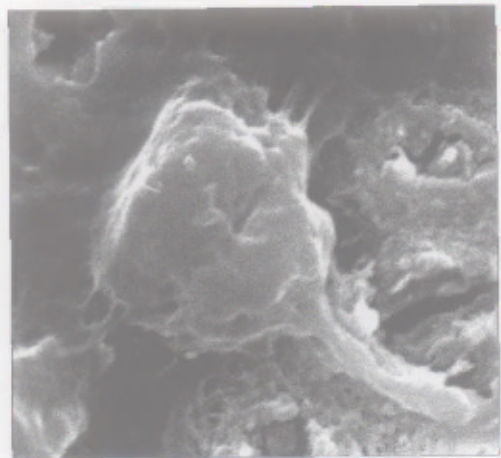


图 4 牙片表面的破骨样细胞 SEM ×4 500  
Fig 4 The osteoclast-like cells on dental slice SEM ×4 500

### 2.3 破骨细胞计数结果

培养第7天进行多核破骨样细胞计数, A组为(61.3±2.50)个/孔, B组为(59.5±1.05)个/孔, C组为(31.2±2.14)个/孔, D组为(16.7±2.33)个/孔。经统计分析, 除A组与B组间未见统计学差异( $P>0.05$ )外,

其余各组间均存在统计学差异( $P<0.05$ )。

### 3 讨论

目前体外获取破骨细胞的方法主要有机械分离法和骨髓诱导培养法, 而纯化方法主要针对机械分离法获取的成熟破骨细胞。有学者采用机械分离法获取兔长骨的成熟破骨细胞, 于胶原膜上培养, 并用链酶蛋白酶E纯化, 获得了较高的纯化率, 但获得的破骨细胞数量有限<sup>[2-3]</sup>。骨髓诱导培养法可获得的破骨样细胞量明显多于机械分离法。采用1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>诱导是最常用的骨髓诱导培养方法<sup>[4]</sup>, 与地塞米松联用时可刺激破骨细胞形成和骨吸收, 但两者联用的作用机制尚不清楚<sup>[5-6]</sup>。

本研究采用1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>/地塞米松联合诱导培养出生1、12、24和36 d的SD大鼠, 均获得了Trap染色阳性、具有噬骨能力的多核破骨细胞。A、B组的破骨样细胞较C、D组早出现1—2 d, 可能与不同年龄段SD大鼠骨髓细胞的增殖活力不同有关。大鼠乳鼠期为出生后21—28 d<sup>[7]</sup>。本研究中, A、B、C组虽然同处于乳鼠期, 但出现目的细胞的时间和所获得的数量仍有差别。B组破骨样细胞较C组出现早且数量更多; A组破骨样细胞出现时间和数量虽与B组接近, 但A组为新生1 d的大鼠, 其骨髓细胞量少, 要保证相同的细胞接种密度, 就必须牺牲更多的实验动物, 增加原代培养的操作时间, 提高了污染率。因此, 为尽可能多地获取目的细胞和保证细胞培养的稳定性和可操作性, 在本研究条件下选择出生10—12 d的SD大鼠较适宜。

破骨细胞具有较强的贴壁能力和抗胰酶特性<sup>[4,8]</sup>, 本研究据此特点采用0.25%胰蛋白酶/0.02% EDTA消化, 获得了高纯度的破骨样细胞, 形态学观察和细胞计数证实该法可靠易行。胰蛋白酶消化能力与胰酶浓度、pH值、温度、细胞条件等因素有关。胰酶浓度越高, 消化能力越强; 一般组织消化分离时pH值以8—9为好, 可使消化后残留的胰酶不会对培养液的pH值造成明显影响; 而消化温度以37℃效果最好<sup>[9]</sup>。因为破骨细胞较脆弱<sup>[1]</sup>, 适宜在酸性环境下培养, 因此经过反复观察比较, 本研究采用室温下、pH值为7.5—7.6的0.25%胰蛋白酶/0.02% EDTA进行消化, 获得了较好的纯化效果。此外, 纯化时细胞的贴壁生长情况也很重要。只有贴壁良好的细胞才有可能掌握好条件, 达到纯化要求。因此, 操作时必须严格贯彻无菌原则, 避免污染; 及时换液, 保证充足养分。操作中须随时在倒置显微

(下转第361页)



- by osteogenin and bone morphogenetic proteins: Challenges for biomechanical and tissue engineering[J]. J Biomech Eng, 1991, 113(2): 189-190.
- [4] Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, et al. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells( mesenchymal progenitor cells): Implications for therapeutic use[J]. Bone Marrow Transplant, 1995, 16(4): 557-564.
- [5] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147.
- [6] Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, et al. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cell[J]. J Bone Joint Surg Am, 1998, 80(12): 1745-1757.
- [7] Robinson D, Ephral M, Mendes DG. The mesenchymal stem cell in orthopedics[J]. Orthop Int, 1993, 1: 448-453.
- [8] Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks[J]. Clin Orthop Relat Res, 1991,(262): 298-311.
- [9] Rivard CH, Brader C, Rhalmi S, et al. Bioabsorbable synthetic polyesters and tissue regeneration: A study of three-dimensional proliferation of bovine chondrocytes and osteoblasts[J]. Ann Chir, 1996, 50(8): 651-658.
- [10] Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, et al. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects[J]. J Bone Joint Surg Am, 1998, 80(7): 985-996.
- [11] Vacanti CA, Kim WS, Upton J, et al. Tissue-engineered growth of bone and cartilage[J]. Transplant Proc, 1993, 25(1): 1019-1021.
- [12] Kim WS, Vacanti JP, Cima L, et al. Cartilage engineered in pre-determined shapes employing cell transplantation on synthetic biodegradable polymers[J]. Plast Reconstr Surg, 1994, 94(2): 233-237.
- [13] 杨志明. 组织工程的发展趋势[J]. 中国修复重建外科杂志, 2003, 17(2): 81-82.  
(YANG Zhi-ming. Development tendency of tissue engineering[J]. China J Reparative Reconstructive Surg, 2003, 17(2): 81-82.)
- [14] 李彦林, 杨志明, 解慧琪, 等. 生物衍生组织工程骨支架材料的制备及理化特性[J]. 生物医学工程学杂志, 2002, 19(1): 10-12.  
(LI Yan-lin, YANG Zhi-ming, XIE Hui-qi, et al. Experimental studies on procedures and properties of natural derived scaffold materials of tissue engineered bone[J]. J Biomed Eng, 2002, 19(1): 10-12.)
- [15] 杨志明, 李彦林, 解慧琪, 等. 生物衍生骨支架材料的组织相容性研究[J]. 中华整形外科杂志, 2002, 18(1): 6-8.  
(YANG Zhi-ming, LI Yan-lin, XIE Hui-qi, et al. Experimental studies on histocompatibility of three bio-derived bones[J]. Chin J Plast Surg, 2002, 18(1): 6-8.)
- [16] Lin FH, Liao CJ, Chen KS et al. Preparation of biphasic porous bioceramic by heating bovine cancellous bone with  $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  addition[J]. Biomaterials, 1999, 20(1): 475-484.
- [17] Hillsley MV, Frangos JA. Bone tissue engineering: The role of interstitial fluid flow[J]. Biotechnol Bioeng, 1994, 43(7): 573-581.
- [18] Cornell CN, Lane JM. Current understanding of osteoconduction in bone regeneration[J]. Clin Orthop Relat Res, 1998,(355 Suppl): S267-S273.

( 本文编辑 王 晴)

( 上接第 352 页)

镜下观察, 消化时间不宜过长, 可短时多次, 达到要求后及时终止, 彻底清除剩余消化液。

### [参考文献]

- [1] Roodman GD. Advances in bone biology: The osteoclast[J]. Endocrine Rev, 1996, 17(4): 308-332.
- [2] Kakudo S, Miyazawa K, Kameda T, et al. Isolation of highly enriched rabbit osteoclasts from collagen gels: A new assay system for bone resorbing activity of mature osteoclasts[J]. J Bone Miner Metab, 1996, 14(1): 129-136.
- [3] Tezuka K, Sato T, Kamioka H, et al. Identification of osteopontin in isolated rabbit osteoclasts[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1992, 186(2): 911-917.
- [4] Tsukii K, Shima N, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor mediates an essential signal for bone resorption induced by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3, prostaglandin E2, or parathyroid hormone in the microenvironment of bone[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 246(2): 337-341.
- [5] Itonaga I, Sabokbar A, Neale SD, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 and prostaglandin E2 act directly on circulating human osteoclast precursors[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 264(2): 590-595.
- [6] Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor( OCIF) and osteoprotegerin( OPG): A mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro[J]. Endocrinology, 1998, 139(3): 1329-1337.
- [7] 罗满林, 顾为望. 实验动物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 146-147.  
(LUO Man-lin, GU Wei-wang. Experimental zoology[M]. Beijing: The Publishing Company of Chinese Agriculture, 2002: 146-147.)
- [8] 刘 波, 于世凤, 庞淑珍. 高产量高纯度的破骨细胞分离培养[J]. 中国骨质疏松杂志, 2004, 10(4): 409-411.  
(LIU Bo, YU Shi-feng, PANG Shu-zhen. Isolation of highly enriched and purified rabbit osteoclasts and osteoclast-like cells[J]. Chin J Osteoporosis, 2004, 10(4): 409-411.)
- [9] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2004: 68-69.  
(SI-TU Zhen-qiang, WU Jun-zheng. Cell culture[M]. Xi an: The World Publishing Company, 2004: 68-69.)

( 本文编辑 吴爱华)