

[文章编号] 1000-1182(2008)06-0599-05

高纯度破骨样细胞体外培养及功能表达的研究

刘文佳¹, 王晓庚¹, 周 洪¹, 李 昂²

(1.西安交通大学医学院附属口腔医院 正畸科; 2.医学研究中心, 陕西 西安 710004)

[摘要] 目的 建立大量高纯度破骨样细胞体外培养的方法,并运用分子生物学技术观察体外诱导培养的破骨样细胞标志酶的基因表达。方法 按照巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF) 30 ng/mL、核因子κB受体活化因子配基(RANKL) 50 ng/mL的质量浓度对骨髓单个核细胞诱导培养6 d,利用形态学观察、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色、Giemsa染色、骨吸收陷窝检测以及破骨细胞标志酶基因表达的检测,对生成的破骨样细胞进行鉴定。结果 实验获得的破骨样细胞中,TRAP阳性的单核破骨样细胞多见、TRAP阳性的多核破骨样细胞数量相对较少,胞核从2个到十几个不等;光镜下牙本质片上可见各种形态的骨吸收陷窝;应用RT-PCR方法证实破骨样细胞表达膜型基质金属酶(MT1-MMP)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、TRAP和组织蛋白酶K(CK)4种标志酶。结论 以M-CSF和RANKL作为诱导因子,对大鼠骨髓单个核细胞进行诱导培养可以获得具有典型的破骨细胞形态特征,可以表达特征性标志酶基因,且数量大、纯度高。

[关键词] 破骨样细胞; 细胞培养; 巨噬细胞集落刺激因子

[中图分类号] R783.5 **[文献标识码]** A

Differentiation and functional expression of highly purified osteoclast-like cells *in vitro* LIU Wen-jia¹, WANG Xiao-geng¹, ZHOU Hong¹, LI Ang². (1. Dept. of Orthodontics, Stomatological Hospital, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China; 2. Medicine Research Center, Stomatological Hospital, Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China)

[Abstract] **Objective** To establish a culture method for a large amount of highly purified osteoclast-like cells *in vitro*. To investigate the gene expression of some osteoclast marker enzymes. To lay the foundation for the further study of the signal path on the differentiation and formation of osteoclast-like cells. **Methods** The bone marrow mononuclear cells of rat were treated with 30 ng/mL macrophagecolony-stimulating factor(M-CSF) and 50 ng/mL receptor activator of NF-κB ligand(RANKL) and cultured for 6 days. After culturing, cells were evaluated by morphology observation, tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP) staining, Giemsa staining, pit staining, and the gene expression of some osteoclast marker enzymes. **Results** The TRAP-positive mononuclear cells were more frequently observed than the multinucleated cells and pit staining could be seen on the dentine slice. The transcription expression of TRAP, matrix metalloproteinase-9(MMP-9), membrane-type1-matrix metalloproteinase(MT1-MMP) and cathepsin K were detected by RT-PCR. **Conclusion** The cooperation of M-CSF and RANKL could induce a large amount of highly purified osteoclast-like cells formation in rat bone marrow culture. The typical characteristics of osteoclast-like cells were demonstrated and the enriched osteoclast-like cells expressed TRAP, MMP-9, MT1-MMP and cathepsin K.

[Key words] osteoclast-like cells; cell culture; macrophagecolony-stimulating factor

破骨细胞(osteoclasts, OC)是具有独特骨吸收功能的多核巨细胞,来源于造血细胞系,由单核细胞融合而成,不能增殖和传代^[1]。破骨样细胞(osteoclast-like cells, OLC)是指原代培养或实验诱导生成的,具有OC性质,用于细胞学或分子生物学研究

的细胞。OLC与OC的不同是前者用于实验研究,而后者位于骨改建部位。与多数生物学和功能学研究要求不同,细胞生化和分子生物学研究要求大量高纯度OLC,然而OC为高代谢的分化终末细胞,组织含量极少又非常脆弱,给OC(特别是大量高纯度OC)的分离培养带来困难,并成为生物化学和分子生物学研究进展的限制性因素。本研究建立大量高纯度OLC体外培养的方法,以期对骨代谢机制的进一步研究提供新的手段和途径。

[收稿日期] 2008-02-11; [修回日期] 2008-05-03

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30471911)

[作者简介] 刘文佳(1982-),女,上海人,硕士

[通讯作者] 周 洪, Tel: 029-87218285

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 4周龄SD雄性大鼠(108±8) g 2只(西安交通大学医学院实验动物中心提供)。

1.1.2 主要试剂 α -MEM培养基(Gibco公司,美国),胎牛血清FBS(中国医学科学院生物工程研究所),细胞分离液Histopaque-1083、巨噬细胞集落刺激因子(macrophagecolony-stimulating factor, M-CSF)、核因子 κ B受体活化因子配基(receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL)、萘酚AS-BI磷酸盐、N,N-二甲基酰胺(Sigma公司,美国),琼脂糖(Oxoid公司,英国),DNA分子Marker、RNA提取试剂盒、RT-PCR试剂盒(TaKaRa公司,日本)。

1.2 玻片及牙本质片的制备

将4 mm×4 mm盖玻片经超声清洗后浸入硫酸-重铬酸钾溶液中过夜,充分水洗,烤干,高压灭菌后备用。取因正畸矫治需要拔除的健康牙,去除冠部釉质,冷却下制备4 mm×4 mm、厚100~200 μ m的牙本质片,蒸馏水中超声清洗10 min×3次,置于体积分数为75%乙醇中,4 $^{\circ}$ C保存备用,使用前在超净台中紫外灯下照射过夜消毒。

1.3 破骨样细胞培养

按照常规方法分离出鼠骨髓基质细胞,用 α -MEM全培养液(含体积分数为15%胎牛血清、青霉素100 U/mL、链霉素100 μ g/mL)重悬,加入M-CSF(10 ng/mL),分置于2个25 cm²培养瓶中,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱内培养24 h。24 h后,收集细胞悬液,离心, PBS清洗, Histopaque分离液分离单个核细胞,再用 α -MEM全培养液制备细胞悬液(每毫升 2×10^6 个)。按照M-CSF 30 ng/mL, RANKL 50 ng/mL的质量浓度将分装好的诱导因子稀释,再与单个核细胞悬液充分混合,将混合液分注于2个6孔培养板中,每孔3.3 mL,其中2孔预置盖玻片及牙本质片。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱内培养6 d,每3 d换液1次。

1.4 细胞形态学观察

应用倒置相差显微镜观察培养细胞的形态、生长贴壁情况,单核细胞融合转化情况。

1.5 TRAP染色及Giemsa染色

取培养第7天的细胞爬片,用体积分数为25%戊二醛液4 $^{\circ}$ C固定10~15 min,蒸馏水洗3次;浸入TRAP染色孵育液37 $^{\circ}$ C, 50 min,双蒸水洗3次;细胞爬片的面向下,中性树胶封片,光镜观察。用于Giemsa染色的细胞爬片经体积分数为4%中性甲醛液固定30 min后,蒸馏水冲洗、晾干,用Giemsa应用液完全覆盖样本,染色10 min,自来水冲洗,室温

晾干,甘油明胶封片,光镜观察。

1.6 骨吸收陷窝观察

取培养第7天的骨片经体积分数为25%戊二醛液4 $^{\circ}$ C固定7 min,浓度为0.25 mol/L氢氧化铵超声清洗5 min×3次,系列乙醇脱水2次,每次1 min,自然晾干,10%甲苯胺蓝染液室温染色4 min,蒸馏水洗后光镜下观察。

1.7 破骨细胞标志酶的表达

1.7.1 总RNA提取 按TaKaRa操作说明进行。贴壁细胞用PBS洗2遍;加Trizol裂解液;室温下放置5 min,使细胞充分裂解;加入1/5 Trizol体积的氯仿,振荡混匀(禁用漩涡振荡器,以免基因组DNA断裂),4 $^{\circ}$ C, 12 000 g离心15 min;吸取上层水相至另一个Eppendorf管中(注意不要吸取中间界面);加入与上清液等体积的异丙醇,混匀,室温放置10 min;4 $^{\circ}$ C, 12 000 g离心10 min,弃上清, RNA沉淀于管底;按1 mL 75%乙醇和1 mL Trizol,加入75%乙醇,温和振荡离心管,悬浮沉淀;4 $^{\circ}$ C, 12 000 g离心5 min,弃上清,保留沉淀;室温凉干,加入100 μ L RNase Free H₂O溶解。

1.7.2 RNA定量及纯度检测 RNA定量:取溶解后RNA样品1/10稀释,紫外分光光度仪上读取260 nm光密度值;计算RNA含量,检测RNA纯度。RNA比值在1.8~2.0之间,说明质量较好;比值小于1.8说明溶液中蛋白质等有机物的污染较明显,比值大于2.2时,说明RNA已有降解。

1.7.3 引物设计与合成 参照文献^[2]设计引物,具体见表1。所有引物由上海生工生物技术有限公司合成。

表 1 RT-PCR引物序列
Tab 1 Primer sequence of RT-PCR

基因	引物序列
MMP-9	F 5'-TGGCCGCGCCACTGTGCGCCCTCCGAG-3'
(663 bp)	R 5'-CACTAGGTTCACTCGTTCGCGGTACT-3'
MT1-MMP	F 5'-CCCCGCTGCGGTGTTCAGAC-3'
(387 bp)	R 5'-CTCCGCGGAGTCAAAGTGGGTGTCCC-3'
CK	F 5'-AGCTGGGGAGAAAGCTGGGGAAACAAAG-3'
(244 bp)	R 5'-AGGCACAAACAAATGGGGAAACCAACA-3'
TRAP	F 5'-AAGGAGGACTACCTGCTCGTGGCCGGC-3'
(189 bp)	R 5'-TCCACTCAGCACGTAGCCACGCCGTT-3'

1.7.4 RT-PCR检测 cDNA合成(RT反应):取2 μ g总RNA于0.2 mL Eppendorf管中(放置冰浴中操作);按下列加入10 μ L反应体系: MgCl₂ 2 μ L, 10×RT Buffer 1 μ L, dNTP Mixture(各10 mmol/L) 1 μ L, Random 9mers(100 μ mol/L) 0.5 μ L, AMV Reverse

Transcriptase 0.5 μL , RNase Inhibitor 0.25 μL , 总RNA ($\leq 500\text{ ng}$) 1 μL , RNase Free dH_2O 3.75 μL ; 离心数秒, 放置于PCR扩增仪上进行反应; 反应条件: 30 $^\circ\text{C}$ 10 min; 42 $^\circ\text{C}$ 15 min(反转录反应); 99 $^\circ\text{C}$ 5 min(灭活转录酶); 5 $^\circ\text{C}$ 5 min。

PCR反应: 按下列加入40 μL PCR反应体系(5 \times PCR Buffer 10 μL , dH_2O 28.75 μL , TaKaRa Ex Taq HS 0.25 μL , 上游PCR引物0.5 μL , 下游PCR引物0.5 μL); 将40 μL PCR反应体系加入到上述反转录反应管中, 离心数秒; 反应条件: 94 $^\circ\text{C}$ 2 min 1循环; 94 $^\circ\text{C}$ 30 s; 55~60 $^\circ\text{C}$ 30 s; 72 $^\circ\text{C}$ 0.5~4 min; 25~35循环。

2 结果

2.1 破骨样细胞形态学观察

初培养时, 细胞数量较多; 培养第2天时, 部分细胞伸出伪足; 培养第3天时, 悬浮于培养液中

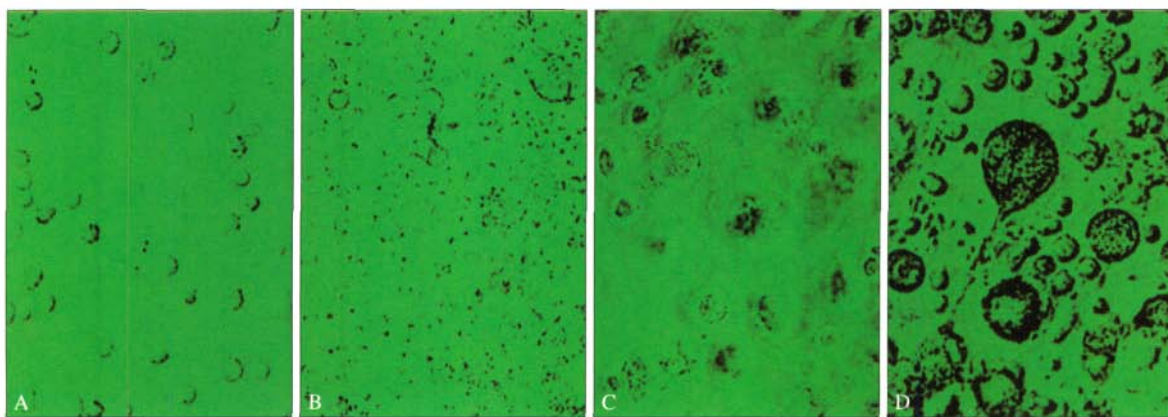
的未贴壁细胞随换液被除去, 剩余的贴壁细胞胞体逐渐变大; 培养第4天时, 可观察到单个核细胞开始融合; 培养第5、6天时, 细胞呈现多种形态(图1)。

2.2 破骨样细胞TRAP染色

培养6 d后附着于盖玻片上的细胞, 经染色后可见单核及多核的OLC胞浆呈紫红色沉淀反应, 颜色不均匀, 呈典型的“荷包煎蛋”样形态。其中, 以TRAP阳性的单核OLC多见; TRAP阳性的多核OLC数量相对较少, 胞核从2个到十几个不等。局部区域单个核OLC聚集成群, 可见胞体融合的现象(图2)。

2.3 破骨样细胞骨吸收陷窝检测

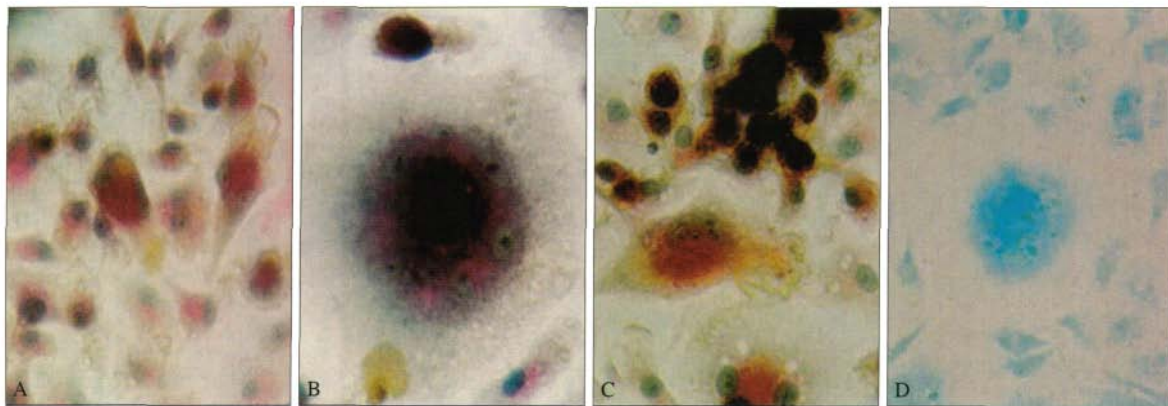
光镜下观察牙本质片上, 牙本质小管按一定方向排列, 呈淡蓝色(图3A), 偶见骨吸收陷窝, 呈蓝紫色圆形、椭圆形、腊肠形等多种形态, 边界较清楚, 陷窝底纤维纹路隐约可辨(图3B)。



A: 第1天; B: 第2天; C: 第4天; D: 第6天

图1 培养的破骨样细胞形态 倒置相差显微镜 $\times 200$

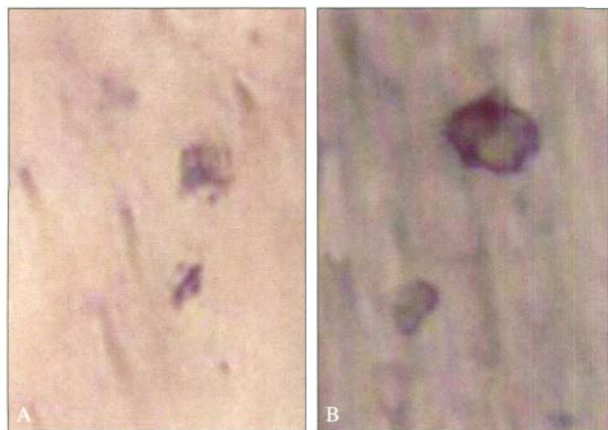
Fig 1 Observation of OLC inverted phase-contrast microscope $\times 200$



A: 双核破骨样细胞 TRAP+HE染色 $\times 160$; B: 多核破骨样细胞 TRAP+HE染色 $\times 160$; C: 破骨样细胞聚集 TRAP+HE染色 $\times 160$; D: 多核破骨样细胞 Giemsa染色 $\times 160$

图2 培养的破骨样细胞染色结果

Fig 2 Staining results of OLC



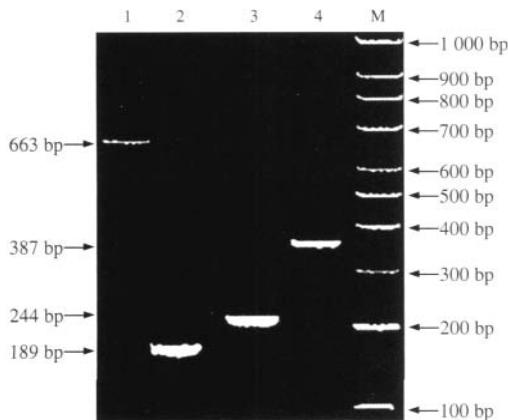
A: 牙本质小管; B: 骨吸收陷窝

图3 骨吸收陷窝的染色 甲苯胺蓝染色 $\times 160$

Fig 3 Staining of absorption pit for OLC toluidine blue staining $\times 160$

2.4 破骨样细胞标志酶的表达

分别经25~35扩增循环后,取10 μ L扩增产物,2%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,在凝胶成像分析仪上观察结果。结果显示OLC表达膜型基质金属酶(membrane-type1-matrix metalloproteinase, T1-MMP)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinases, MMP-9)、抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)和组织蛋白酶K(cathepsin K, CK)4种标志酶(图4)。



M: 100 bp DNA Ladder; 1: MMP-9; 2: TRAP; 3: CK; 4: MT1-MMP

图4 破骨样细胞标志酶RT-PCR电泳图

Fig 4 Gel electrophoresis of RT-PCR of OLC marker enzyme

3 讨论

3.1 破骨样细胞的纯化

OC是终末细胞,不能传代,且生命周期短暂,体外培养非常困难。目前,体外分离培养OC的基本方法有3种:机械分离培养法、凝胶纯化培养法和诱导培养法。体外诱导培养获得的OLC数量相对较多,纯度较高。本实验在分离的大鼠骨髓单个核细胞(bone marrow mononuclear cells, BM-MNCs)中

加入低剂量的M-CSF(10 ng/mL),目的在于刺激BM-MNCs的增殖,增加破骨细胞前体细胞(preosteoclasts, pOCs)的数量;使用低剂量的M-CSF诱导24 h后,收集未贴壁细胞,则利用BM-MNCs在低剂量的M-CSF诱导条件下贴壁时间相对较长的特性进行了第一次纯化^[3];此后,使用大鼠单核细胞分离液,高速离心后取白膜层获得了高纯度的BM-MNCs,从而避免了杂细胞的干扰,所获得的TRAP阳性的单核及多核OLC纯度高达99%,每只大鼠获得细胞量约为 2×10^6 个,多核OLC胞核从2个到十几个不等,表达特征性标志酶,具有典型的蚀骨特征。

3.2 破骨样细胞诱导因子的选择

OC来源于单核/巨噬细胞系的造血前体细胞,由这些单核细胞经分化、融合而成^[4],其前体细胞位于骨髓、脾及外周血内^[5]。一些全身性激素类刺激因子对OC的形成和活性有促进作用,如1,25二羟基维生素D₃、甲状旁腺激素、前列腺E₂、白细胞介素-6、白细胞介素-1、肿瘤坏死因子等。然而,能直接调控OC分化的只有RANKL和M-CSF,可诱导OC的特征性基因如耐酒石酸酸性磷酸酶、组织蛋白酶K、降钙素受体及 β_3 整合素的表达,促进OC的成熟^[6]。Tsurukai等^[7]经实验证明在骨吸收刺激因子存在情况下,将正常小鼠的颅骨细胞与骨髓细胞共同培养可生成OC,但是如果用M-CSF缺陷小鼠的颅骨细胞与骨髓细胞共同培养,则不会产生pOCs和OC,只有在加入外源性的M-CSF后,才会有pOCs及OC的生成。直接参与骨代谢的RANKL由成骨/基质细胞分泌,通过旁分泌方式发挥作用,RANKL的主要作用机制是与成熟OC胞膜表面的NF- κ B受体激活物相结合,直接促进成熟OC的活化。因此,本实验选择RANKL和M-CSF作为诱导因子,刺激BM-MNCs分化为OLC。

3.3 破骨样细胞标志酶基因表达

抗酒石酸酸性磷酸酶主要由OC释放,参与骨基质中钙磷矿化底物的降解,故血浆中的抗酒石酸酸性磷酸酶水平可反映OC活性和骨吸收的状态^[8]。

OC在进行骨吸收以前必须穿过类骨质移动到矿化骨表面,这个过程中金属基质蛋白酶的胶原降解功能起到了重要作用。Blavier等^[9]发现MMP抑制剂能够完全抑制长骨骨髓腔的形成,因此认为,MMP是OC移动到骨吸收表面的关键性因素。MMP-9在OC中呈特异性高表达,进一步研究^[10]发现,MMP-9的缺失阻碍了OC的移动,OC会聚集在类骨质和软骨界面处;OC合成分泌MMP的增加可作为其溶骨活性增强的标志。Pap等^[11]应用免疫组化双染色观察到

MT1-MMP在骨质破坏处OLC中表达,认为MT1-MMP参与了骨质破坏。

组织蛋白酶是一大类主要存在于溶酶体的胞内蛋白酶,OC中组织蛋白酶K(溶酶体含有的半胱氨酸蛋白酶)选择性高表达,是OC作用中最主要的胞内蛋白酶,它选择性的在OC介导的骨吸收中起特殊的作用^[12],是介导OC引起骨吸收的重要因素。

本实验以M-CSF和RANKL作为诱导因子,对大鼠BM-MNCs进行诱导培养,所获得的细胞具有典型的OC形态特征,TRAP染色阳性,可产生骨吸收陷窝,表达特征性标志酶TRAP、MMP-9、MT1-MMP、CK,且数量大、纯度高,为骨代谢机制的进一步研究提供了新的手段和途径,是研究各种因素对OC分化过程影响的重要方法,对于有效控制牙移动,加速骨改建将产生深远的影响。

【参考文献】

- [1] Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation[J]. *Nature*, 2003, 423(3) :337-342.
- [2] 高建军, 顾淑珠, 金慰芳, 等. 高纯度破骨细胞分离培养与功能表达[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2001, 7(1) :15-17.
GAO Jian-jun, GU Shu-zhu, JIN Wei-fang, et al. Isolation of highly enriched osteoclasts and their functional expression[J]. *Chin J Osteoporosis*, 2001, 7(1) :15-17.
- [3] Lee SE, Chung WJ, Kwak HB, et al. Tumor necrosis factor- α supports the survival of osteoclasts through the activation of Akt and ERK[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(52) :49343-49349.
- [4] Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, et al. The bone marrow-

- derived stromal cell lines MC3T3-G2/PA6 and ST2 support osteoclast-like cell differentiation in cocultures with mouse spleen cells[J]. *Endocrinology*, 1989, 125(4) :1805-1813.
- [5] Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification[J]. *Genes Dev*, 1998, 12(9) :1260-1268.
 - [6] Rieman DJ, McClung HA, Dodds RA, et al. Biosynthesis and processing of cathepsin K in cultured human osteoclasts[J]. *Bone*, 2001, 28(3) :280-289.
 - [7] Tsurukai T, Udagawa N, Matsuzaki K. Roles of macrophage-colony stimulating factor and osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis[J]. *J Bone Miner Metab*, 2000, 18(4) :177-184.
 - [8] Engsig MT, Chen QJ, Vu TH, et al. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones[J]. *J Cell Biol*, 2000, 151(4) :877-879.
 - [9] Blavier L, Delaissé JM. Matrix metalloproteinases are obligatory for the migration of presosteoclasts to the developing marrow cavity of primitive long bones[J]. *J Cell Sci*, 1995, 108(Pt 2) :3649-3659.
 - [10] Lee ER, Murphy G, El-Alfy M, et al. Active gelatinase B is identified by histozyomography in the cartilage resorption sites of developing long bones[J]. *Dev Dyn*, 1999, 215(3) :190-205.
 - [11] Pap T, Shigeyama Y, Kuchen S, et al. Differential expression pattern of membrane-type matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(6) :1226-1232.
 - [12] Brubaker KD, Vessella RL, True LD, et al. Cathepsin K mRNA and protein expression in prostate cancer progression[J]. *J Bone Miner Res*, 2003, 18(2) :222-230.

(本文编辑 汤亚玲)

百强固位纤维

百强固位纤维是法国碧兰公司最新推出的一种牙科用多功能固位纤维,注册证号:国食药监械(进)字20072630324。

百强固位纤维主要用于:1)松动牙固定;2)正畸后的保持;3)缺失牙即刻复位;4)固定或修复临时桥体;5)间隙保持器。

百强纤维带非常柔软,能完全随牙弓的形态贴附于牙面并通过树脂黏固于牙面上。百强的主要材料是交叉编织纤维,由聚对苯二甲酸乙二醇酯构成。经过多种特殊处理,使纤维表面光滑,提高了与树脂的粘接性。其处理方法之一是应用超临界CO₂技术以去除表面杂质,百强是唯一采用该技术的口腔用纤维,其牢固性最强。

百强固位纤维主要应用于牙周和正畸后的治疗,既可以用于临时性固位,又可用于长期、甚至永久性固定。这是一种非侵入性技术,很少需要进行牙齿预备。使用百强固位纤维又是一种可逆操作,必要时可以去除,不伤害牙齿,在治疗过程中可以进行修整。与金属固定材料相比,百强纤维带具有良好的生物相容性。从临床操作角度来看,直接操作,非常简单,无需取印模,没有技工室操作,简化了工作程序,加快了治疗速度。另外,它的优点是位于舌侧,并接近牙齿颜色,美观且舒适。

更详尽的产品信息请咨询法国碧兰公司-艾龙集团,电话:86-10-64657011/2/3/4,电子邮件:beijing@cn.acteongroup.com,网站:www.cn.acteongroup.com。

法国碧兰公司 艾龙集团