文章编号:1000-5404(2008)06-0521-04

论著

小鼠破骨细胞骨髓诱导模型的建立及功能观察

鲁秀敏[1,2],苏 楠[1],李福兵[1],赵 玲[1],陈 林[1] ([1]第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军战创伤中心,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042;[2]重庆工学院生物工程学院,重庆 400050)

摘 要:目的 获得大量高质量小鼠破骨细胞,为体外研究破骨细胞骨吸收功能提供丰富的细胞来源。**方法** 采用巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF)和破骨细胞分化因子(receptor activator of nuclear factor-κB ligand, RANKL)诱导小鼠骨髓单核细胞分化为破骨细胞,并通过抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)染色和骨吸收实验来鉴定破骨细胞及其噬骨能力。**结果** 诱导3 d后可见TRAP(+)多核细胞出现,诱导5 d后骨片上可见蓝紫色的吸收陷窝。随着培养时间的延长,TRAP(+)多核细胞数目和吸收陷窝呈现时间依赖性增长趋势($P<0.05$)。**结论** M-CSF和RANKL诱导小鼠骨髓单核细胞可产生大量的具有活跃噬骨能力的破骨细胞。

关键词: 破骨细胞;TRAP染色;骨吸收
中图法分类号: R-332;R322.71;R329.2 **文献标识码:** A

Establishment of experimental model of osteoclast differentiation induced by bone marrow mononuclear phagocytes of mouse

LU Xiu-min[1,2], SU Nan[1], LI Fu-bing[1], ZHAO Ling[1], CHEN Lin[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Trauma Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, [2]College of Bioengineering, Chongqing Institute of Technology, Chongqing 400050, China)

Abstract: Objective To obtain plenty of pure osteoclasts for researching the function of osteoclasts *in vitro*. Methods Osteoclasts were induced by bone marrow mononuclear phagocytes of mouse using medium with macrophage colony stimulating factor (M-CSF) and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL). The tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) staining and bone resorption experiment were used to identify the osteoclasts. Results The TRAP positive multinuclear cells were induced from mouse bone marrow mononuclear phagocytes after 3 days of inoculation, and plenty of resorption pits formed on bone slices after 7 days of inoculation. The number of TRAP positive multinuclear cells and bone resorption pits gradually increased during the period of induction. Conclusion The osteoclasts were successfully induced from bone marrow mononuclear phagocytes in the presence of M-CSF and RANKL.

Key words: osteoclast; tartrate resistant acid phosphatase; bone resorption

破骨细胞是人体生理性骨重建和病理性骨破坏过程中高度特异性的唯一具有骨质吸收功能的多核巨细胞,来源于骨髓单核/巨噬细胞系。破骨细胞体外培养方法的建立利于从细胞与分子水平进行骨吸收机制的研究,从而有助于骨质疏松症、骨硬化症等代谢性骨病治疗药物的开发研究。破骨细胞的分离培养主要有两种方法:一种是从实验动物四肢长骨分离培养成熟的破骨细胞,该方法获得的破骨细胞可直接用于生物学功能和药效学研究,然而该方法获得的破骨细胞数量少、存活时间短,无法满足破骨细胞分子生物学方面的研究需要;另一种是采用骨髓单核细胞诱导,该方法可获得大量的破骨细胞,能满足体外破骨细胞骨吸收机制研究的需要。本实验在巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, M-CSF)和破骨细胞分化因子(receptor activator of nuclear factor-κB ligand, RANKL)两种细胞因子共同存在的条件下成功建立了破骨细胞体外培养模型,获得的破骨细胞数量

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(2005CB522604);国家自然科学杰出青年基金(30425023);国家自然科学基金(30530410)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, 2005CB522604), the National Science Fund for Distinguished Young Scholars (30425023) and the National Natural Science Foundation of China (30530410)
作者简介:鲁秀敏,女,山东省青州市人,博士研究生,讲师,主要从事组织损伤与修复方面的研究。电话:(023)68757040
通信作者:陈 林,电话:(023)68757408
收稿日期:2007-08-30;修回日期:2007-12-11

多、功能活跃,为破骨细胞的体外功能研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

小鼠重组 sRANKL(Santa Cruz);小鼠重组 M-CSF(Genetics Institute);α-MEM 培养基(Gibco);优质胎牛血清(Gibco);胰蛋白酶(Sigma);TRAP 染色试剂盒(Sigma);总 RNA 抽提试剂盒(Genemega);反转录试剂盒(TaKaRa)。实验动物为 SPF 级 C57 小鼠,4 ~8 周龄,均为雄性(大坪医院实验动物中心)。

1.2 方 法

1.2.1 牛皮质骨片的制备及处理 参考刘波等[1]方法,新鲜牛皮质骨纵切成厚约 200 μm 的骨片,用水洗砂纸磨薄至 50 μm,眼科剪修剪成面积为 0.5 cm × 0.5 cm 的骨片,超声波清洗 3 次,每次 10 min。蒸馏水冲洗后浸泡在含青霉素 1 000 U/ml、链霉素 1 000 U/ml 的 D-Hanks 液中,换液 3 次,每次 30 min,最后置 α-MEM 培养液中备用。

1.2.2 破骨细胞的诱导及鉴定 参考 Takahashi 等[2]方法,将小鼠断颈处死,在无菌条件下分离股骨及肱骨,剪断两侧骨骺端,用 1 ml 注射针头将 α-MEM(含 1 000 U/ml 青霉素,1 000 U/ml 链霉素,2 mmol/L 的 L-谷胺酰氨,10 % 胎牛血清)轻轻冲洗骨髓腔,收集骨髓细胞混合液,于 200 目筛网过滤并接种至培养皿中,37 ℃、5 % CO_2 培养 24 h。收集未贴壁的细胞,1 000 r/min,离心 5 min,沉淀用 α-MEM 培养液重悬,计数并调整细胞浓度为 5×10^6 ml^{-1} 后接种于预先置放玻片或骨片的培养皿中。培养 48 h 后用 PBS 充分冲洗,以去除未黏附的淋巴细胞及血细胞,以贴壁的骨髓单核细胞作为诱导破骨细胞的前体细胞。根据培养液中是否加入 25 ng/ml M-CSF 和 30 ng/ml 的 RANKL 分为实验组和对照组,每个处理设 3 个重复。每 2 天换液 1 次,每次换液 50%。

诱导 3、5、7、9、11、13、15 d 后,将贴有细胞的玻片取出固定,按说明书进行 TRAP 染色,中性树胶封固,光镜下观察,以 TRAP(+)多核细胞(3 个或 3 个以上)为破骨细胞。每个处理取 3 张玻片,每张玻片在 40 倍光镜下随机取 6 个视野进行破骨细胞计数,取均值,结果以细胞个数/玻片表示。

1.2.3 破骨细胞骨吸收功能检测 根据王洪复等[3]的方法,诱导 3、5、7、9、11、13、15 d 后,将贴有细胞的骨片取出,PBS 充分冲洗后,2.5% 戊二醛 4 ℃下固定 10 min,50 kHz 超声清洗 3 次,每次 5 min,系列乙醇脱水,自然晾干,1 % 甲苯胺蓝染液室温下染色 3 ~4 min,蒸馏水清洗后,于光镜下对陷窝(圆形、椭圆形和腊肠等典型形态,边界清楚的蓝色异染区)观察采像,利用 SPOT RT camera/software 软件对陷窝面积进行统计,每个处理取 3 个骨片进行统计分析。

1.2.4 破骨细胞标志酶基因表达检测 诱导培养 1、3、5、7、9、11 d 后按 Genemega 试剂盒说明提取破骨细胞总 RNA,两步法半定量 RT-PCR 扩增破骨细胞标志酶基因,同时以 β-actin 为内参,破骨细胞标志酶、内参及相应引物见表 1。PCR 反应程序为:94 ℃ 30 s,58 ℃ 20 s,72 ℃ 1 min,共 28 个循环。

表 1 破骨细胞标志酶、内参及相应的引物

破骨细胞标志酶及内参	引物(5′→3′)
MMP-9	正义链: CCTGTGTGTTCCCGTTCATCT
	反义链: ACCCGAATCTAGTAAGGTCGC
Cathepsin K	正义链: GGAAGAAGACTCACCAGAAGC
	反义链: GACACCTCCGCCGATATATCG
TRAP	正义链: GCTGGAAACCATGATCACCT
	反义链: TTGAGCCAGGACAGCTGAGT
β-actin	正义链: TTGTTACCAACTGGGACGACATGG
	反义链: GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG

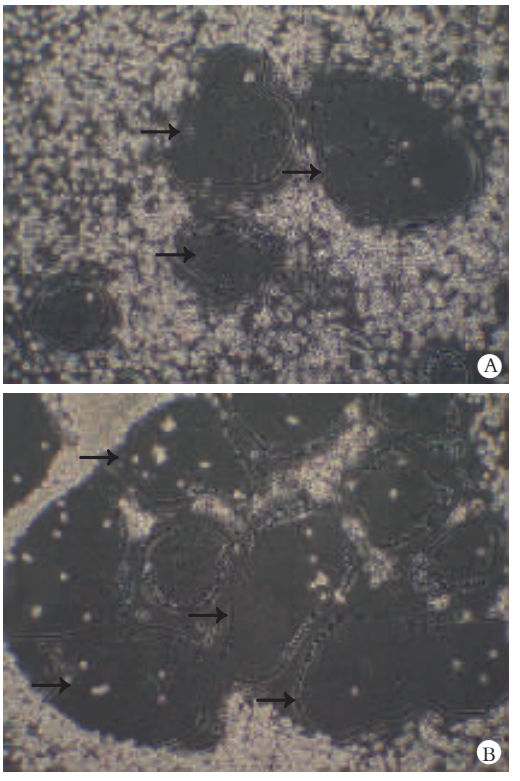
1.3 统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件进行方差分析及 t 检验。

2 结果

2.1 破骨细胞形态特征观察

诱导培养结果显示,接种 12 h 后细胞开始贴壁,为体积较小的圆形细胞,大小一致,分布均匀;72 h 后细胞形态发生明显变化,出现多核细胞(圆形、椭圆形或腊肠型等),细胞边缘不规则,有突起和伪足,细胞内有数个或数十个细胞核,细胞质内可见大小不等的空泡;随着诱导时间的延长,破骨细胞数量逐渐增多,体积不断增大。而对照组只有少量破骨细胞形成,体积小,铺展不开(图 1)。



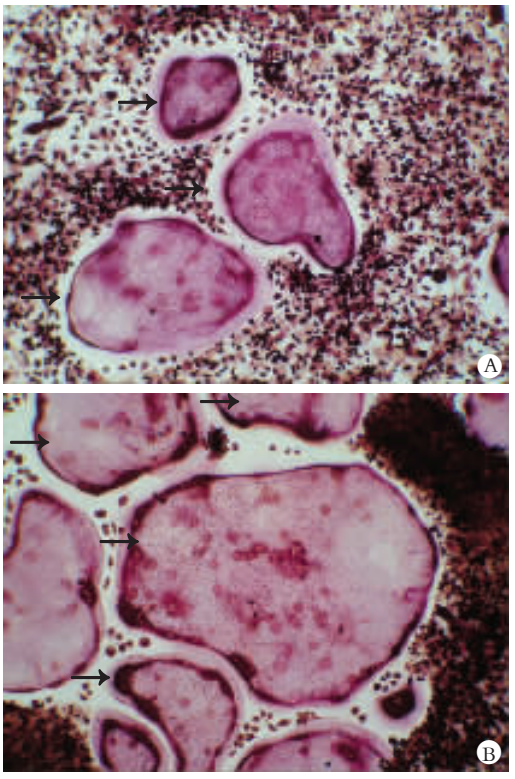
A:对照组;B:实验组; →:破骨细胞

图 1 培养 9 d 破骨细胞形态学观察 (倒置显微镜 ×200)

2.2 破骨细胞 TRAP 染色观察与计数

对诱导不同阶段的骨髓单核细胞进行 TRAP 染色,结果表明接种 72 h 后出现阳性多核细胞,细胞质呈紫红色,细胞核未着色如空泡样,核膜着色深,细胞核有的聚集在细胞中央,有的则排列在细胞周边;随着诱导培养时间的延长,实验组破骨样细胞数量明显增加($P < 0.05$),体积不断增大,形态演变为圆形、长梭形、花瓣形等不规则形状,有些细胞还出现伪足,细胞

质内可见细胞核多达 100 个;培养到第 11 天,破骨细胞数量达高峰,第 13 天时破骨细胞数量开始减少,同时发现有些破骨细胞出现崩解现象,细胞边缘变得不清晰。而对照组中破骨细胞数量少,铺展不开且变化趋势不明显(图 2、3)。



A:对照组;B:实验组;→:破骨细胞

图 2　培养 9 d 的破骨细胞 TRAP 染色　(×200)

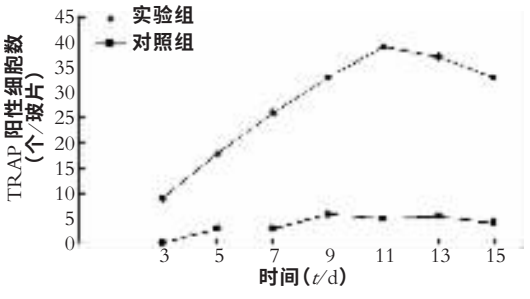


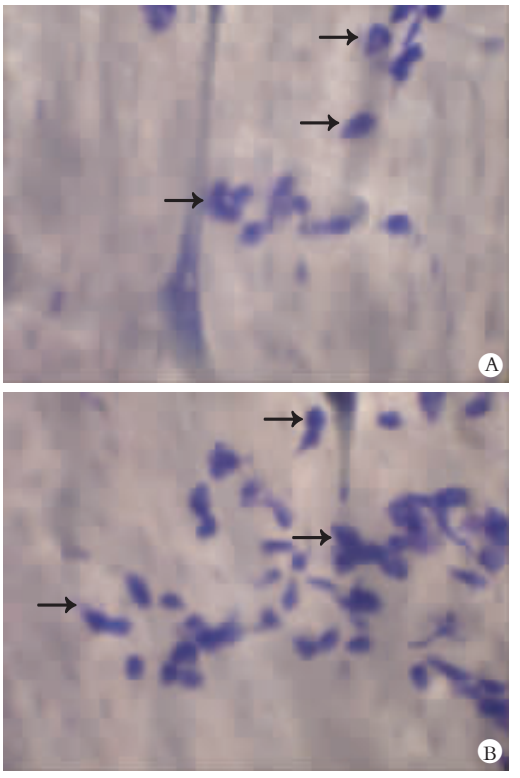
图 3　破骨细胞 TRAP 染色计数

2.3　破骨细胞骨吸收功能检测

骨吸收实验表明诱导培养 5 d 后牛皮质骨片上开始呈现圆形、椭圆形或腊肠型等连续的蓝色骨吸收陷窝,边界清楚、大小不一;而在对照组中陷窝数量少、面积小,这可能和破骨细胞数量少并且功能不佳有关(图 4A)。随着培养时间的延长,实验组骨吸收面积呈明显增加趋势($P<0.05$),而对照组则基本无变化(图 4、5)。

2.4　破骨细胞标志酶基因表达检测

诱导 1 d 后即可检测到微弱的 TRAP 表达信号,而 MMP-9、Cathepsin K 则在诱导培养 3 d 后开始表达。随着诱导培养时间的延长,MMP-9、TRAP 和 Cathepsin K 的表达显著($P<0.05$)增强,呈现一定的时间依赖性(图 6)。该结果与破骨细胞 TRAP 染色计数及破骨细胞骨吸收面积的统计分析结果相一致。



A:对照组;B:实验组;→:骨吸收陷窝

图 4　破骨细胞骨吸收陷窝 1%甲苯胺蓝染色　(×20)

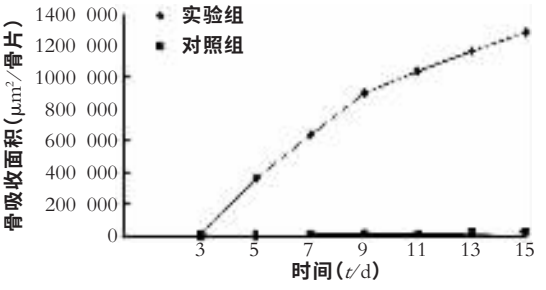
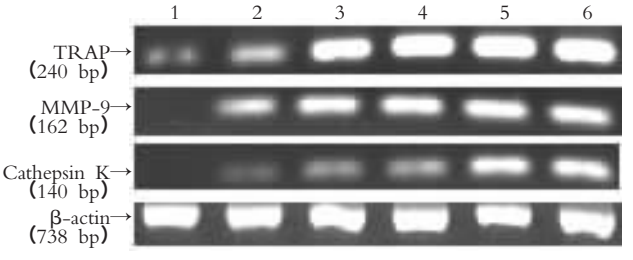


图 5　破骨细胞骨吸收面积



1-6:分别为诱导后 1、3、5、7、9、11 d

图 6　半定量 RT-PCR 检测 TRAP、MMP-9 与 Cathepin K mRNA 表达

3　讨论

破骨细胞是由来自单核/巨噬细胞系的单核前体细胞融合而成的多核细胞,主要受骨髓基质细胞和成骨细胞分泌的细胞因子 RANKL 和 M-CSF 调控,是负责骨吸收的主要功能细胞[4,5]。破骨细胞体外培养是

骨吸收研究和抑制骨吸收药物开发研究的基础。体外诱导培养是目前获得大量破骨细胞最常用的方法,其中骨髓单核细胞是该方法的首选材料,通过诱导可获得大量的具有噬骨功能的破骨细胞。小鼠成熟破骨细胞的分离比较困难,因此有关小鼠破骨细胞功能的体外研究多采用骨髓诱导培养的方法[6,7]。

本实验利用骨髓基质中不同细胞贴壁能力的差异分离出骨髓单核细胞,然后利用生长因子 RANKL 和 M-CSF 进行诱导培养,为满足体外破骨细胞功能及调控机制研究所需要的大量破骨细胞的要求,本实验对原有骨髓诱导培养方法进行了一些调整,主要表现在:①选择健康的 4 ~ 8 周龄雄性小鼠,骨髓中具备诱导潜力的单核细胞较多。②用加有优质胎牛血清 α-MEM 培养基冲洗骨髓腔,分离的骨髓单核细胞活力高。③骨髓混合细胞在重悬前培养 24 h,可使骨髓间充质细胞充分贴壁,从而提高骨髓单核细胞的纯度。④骨髓单核细胞接种密度不低于 5×10^6 ml^{-1},可提高单核细胞集落的密度。⑤破骨细胞的前期诱导非常关键,要及时换液,否则破骨细胞容易退化。

破骨细胞的数量及活力是体外诱导实验成败的关键。通过上述调整,本实验诱导的破骨细胞数量多活力高,主要表现在:从 TRAP 染色及统计结果来看,破骨细胞密度大,主要负责骨吸收的巨核细胞(20 个核以上)数量多;骨吸收实验结果亦显示破骨细胞噬骨坑深,骨吸收面积大,表明破骨细胞骨吸收能力活跃;且破骨细胞在诱导 3 d 后其标志酶基因 MMP-9、Cachepsin K 和 TRAP 均活跃表达。

参考文献:

[1] 刘 波, 于世凤, 庞淑珍. 新伐他汀体外对破骨细胞性骨吸收及大鼠骨代谢的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2005, 11(3): 351 - 355.

[2] Takahashi N, Udagawa N, Tanaka S, *et al*. Generating murine osteoclasts from bone marrow[J]. Methods Mol Med, 2003, 80: 129 - 144.

[3] 王洪复. 骨细胞图谱与骨细胞体外培养技术[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2001: 68 - 69.

[4] Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation[J]. Bone, 2007, 40(2): 251 - 264.

[5] Boyle W J, Simonet W S, Lacey D L. Osteoclast differentiation and activation[J]. Nature, 2003, 423(6937): 337 - 342.

[6] Kartsogiannis V, Ng K W. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology[J]. Mol Cell Endocrinol, 2004, 228(1 - 2): 79 - 102.

[7] Kim H J, Zhao H, Kitaura H, *et al*. Glucocorticoids suppress bone formation via the osteoclast[J]. J Clin Invest, 2006, 116(8): 2152 - 2160.

(编辑 陈聪连)

(上接 520 页)



①:腋动脉;②:变异动脉干;③:旋肱前后动脉共干;④:胸背动脉;⑤:旋肩胛动脉;⑥:肱深动脉;⑦:变异动脉干终支进入三角肌;⑧:腋神经;⑨:肌皮神经;⑩:正中神经

图 1 腋动脉变异大体观察

2 讨论

腋动脉的分支变异较多[3],6 个主要分支中,胸最上动脉、胸肩峰动脉、胸外侧动脉和旋肱前动脉多单独由腋动脉发出。肩胛下动脉与旋肱后动脉共干者可达 41.3%[4]。而该例变异动脉干为肩胛下动脉、旋肱前动脉、旋肱后动脉和肱深动脉 4 支动脉的共干血管较为罕见。目前临床上腋动脉的介入放射学的应用渐趋于向更加精细的血管发展,所以对腋动脉各分支的类型及起始处的外径更加重视。本例血管变异为临床进行血管内导管治疗提供了新的解剖学依据。同时多数情况下锁骨下动脉、腋动脉和肱动脉之间通过分支在肩胛骨和肩峰的周围形成广泛的动脉吻合,由于这些吻合的存在,外伤或手术结扎腋动脉(在肩胛下动脉和旋肱前、后动脉以上)时,侧支循环可以借以上途径建立,不会引起肢体的坏疽。而本例变异的类型给临床手术带来很大的危险,因此在需要结扎腋动脉时,手术前应做详尽的血管造影检查,谨慎选择腋动脉的结扎部位[5]。

关键词: 腋动脉;变异

中图法分类号: R322.121 **文献标识码**: B

参考文献:

[1] 张朝佑. 人体解剖学:下册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 818 - 820.

[2] Williams P L, Warwick R, Dyson M, *et al*. Gray's Anatomy[M]. 37th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1989: 757.

[3] 孙盛斌, 罗 焱, 苏昌兴, 等. 两侧腋动脉分支变异 1 例[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(22): 2061.

[4] 郭世绂. 骨科临床解剖学[M]. 济南:山东科学技术出版社, 2002: 424.

[5] 曹献廷. 手术解剖学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1996: 832.

(编辑 龙 亮)