论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201409146

成年小鼠骨细胞的分离鉴定及其成纤维细胞生长因子受体的表达

唐玉彬[1,2],苏 楠[1],温 轩[1],陈思宇[1],杜晓兰[1],陈 林[1,3] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所:创伤实验室,骨代谢修复中心,创伤烧伤与复合伤国家重点实验室[1],康复科[3];730050 兰州,兰州军区兰州总医院急诊科[2])

[摘要] **目的** 建立稳定的成年小鼠骨细胞分离和鉴定方法,检测其标志性基因和成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor,FGFR)表达。**方法** 将3月龄C57小鼠的胫骨和股骨分离后剪除干骺端,冲去骨髓,切割成约1 mm碎片,用Ⅰ型胶原酶和EDTA溶液交替消化以获取骨细胞。分别通过形态观察、ALP染色、OC染色和E11/gp38染色鉴定骨细胞。qRT-PCR检测骨细胞标志性基因表达,并与骨细胞系IDG-SW3和MLO-Y4比较。检测FGFRs在骨细胞的表达。**结果** 分离出的骨细胞呈多树突状或星状,并借突触彼此连接。ALP染色可见成骨细胞染色阳性,骨细胞染色阴性。OC染色成骨细胞和骨细胞均阳性,成纤维细胞阴性,而E11/gp38染色仅见骨细胞染色阳性。实验所得细胞表达骨细胞特异基因DMP1、SOST、FGF23,表明骨细胞成功分离,且此原代骨细胞与IDG-SW3和MLO-Y4细胞系表达有差异。FGFR1~3在骨细胞中均有表达。**结论** 成功分离成年小鼠原代骨细胞,发现FGFR1~3在原代骨细胞中均有表达。

[关键词] 骨细胞;细胞分离;成纤维细胞生长因子受体
[中图法分类号] R322.71;R329-33;R329.26 [文献标志码] A

Isolation and identification of primary osteocytes from adult mice and analysis of FGFRs expression

Tang Yubin[1,3], Su Nan[1], Wen Xuan[1], Chen Siyu[1], Du Xiaolan[1], Chen Lin[1,2]([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Laboratory of Trauma, Center of Bone Metabolism and Repair, [3]Department of Rehabilitation, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; [2]Department of Emergency Medicine, Lanzhou General Hospital, Lanzhou Military Command, Lanzhou, Gansu Province, 730050, China)

[**Abstract**] **Objective** To establish a stable method to isolate and identify primary osteocytes from adult mice, and then detect the expressions of specific genes and fibroblast growth factor receptors (FGFRs) of the primary osteocytes. **Methods** The femurs and tibiae of 3-month-old mice were dissected. The epiphyses were cut off, and the marrow was flushed out. The long bones were cut into pieces of 1 mm and digested with collagenase I and EDTA solution alternately. The primary osteocytes were identified by morphological observation, alkaline phosphatase (ALP) staining, osteocalcin (OC) staining and E11/gp38 staining. The expressions of specific genes and FGFRs of the primary osteocytes, IDG-SW3 osteocytes and MLO-Y4 osteocytes were analyzed by qRT-PCR. **Results** The isolated primary osteocytes were star-shaped and had more dendrites connected with each other. The primary osteocytes showed negative ALP staining, but positive OC and E11/gp38 staining. Furthermore, these isolated osteocytes also expressed specific genes including DMP1, SOST, and FGF23. FGFR1, FGFR2 and FGFR3 were all expressed in the primary osteocytes. **Conclusion** The primary osteocytes are isolated successfully from adult mice, and FGFR1, FGFR2 and FGFR3 are all expressed in the primary osteocytes.

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划,2014CB942904);国家自然科学基金国际合作与交流项目(81220108020);国家自然科学基金重点项目(81030036);国家自然科学基金面上项目(81471092)
[通信作者] 陈 林,E-mail:linchen70@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141204.1636.013.html(2014-12-04)

[**Key words**] osteocyte; cell isolation; fibroblast growth factor receptors

Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2014CB942904), the International Cooperation and Exchanges of National Natural Science Foundation of China (81220108020), the Key Program of National Natural Science Foundation of China (81030036) and the General Program of National Natural Science Foundation of China (81471092). Corresponding author: Chen Lin, E-mail: linchen70@163.com

骨骼是机体重要的力学支持器官,除了机械功能外,骨骼在人体的代谢、内分泌调节及造血中发挥重要的作用,尤其在维持体内钙磷稳定中起重要作用[1]。骨细胞是终末分化的成骨细胞,是骨组织中数量最多的细胞[2]。骨细胞间通过树突彼此连接形成网络,感受力学信号,调节矿化功能,维持自身周围内环境的稳定。骨细胞除了可以调节自身功能外,还可以通过树突与骨表面的成骨细胞和破骨细胞建立联系[3],调节成骨细胞和破骨细胞的分化,从而影响骨重建[4]。

骨细胞在骨组织的细胞中数量最多,但文献报道相对较少。骨细胞深埋在骨基质中,在活体水平观察和研究具有一定困难。虽然骨细胞系为体外研究骨细胞功能提供了良好的工具,但有些实验必须用原代骨细胞作为实验材料,因此,建立良好的原代骨细胞分离和培养方法尤为重要。早期的骨细胞分离大多采用16 d或18 d鸡的颅骨,或者4 d大鼠、12 d小鼠的颅骨[5-7]。发育早期的颅骨非常薄,容易用乙二胺四乙酸(ethylene diaminetetraaceticacid, EDTA)和胶原酶进行消化。但是这些方法只能分离培养新生动物的骨细胞,且与成年期骨细胞尚有较大差异;此外,颅骨的骨细胞和全身长骨骨细胞也可能存在差异。因此,还需要建立成年期长骨骨细胞的分离和鉴定方法用于骨细胞功能的研究。

成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR)是一类跨膜的酪氨酸激酶受体,有FGFR1~4四种形式。FGFR1~3在骨骼发育和重建过程中发挥重要作用[8-9],但其对骨细胞的调控作用尚不明确。本实验成功分离成年期骨细胞,并检测FGFR1~3在骨细胞中的表达,以期为研究其在骨细胞中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物和细胞系

3月龄C57雄性SPF级小鼠4只,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供,动物批准号:SCXK(渝)2012-0001。骨细胞系IDG-SW3和MLO-Y4由美国Bonewald LF实验室馈赠。

1.2 主要器材

二氧化碳恒温培养箱(德国Thermo公司),荧光显微镜(日本Nikon公司),双人单面超净工作台(苏州净化设备有限公司),倒置显微镜及拍摄系统(德国Leica公司),3.5 cm培养皿(美国Corning公司)。

1.3 主要试剂

α-MEM培养基、优质胎牛血清、Ⅰ型胶原酶、DPBS缓冲液、小牛血清蛋白、鼠尾Ⅰ型胶原(美国Gibco公司),小牛血清(杭州四季青生物公司),EDTA(安徽Biosharp公司),E11/gp38抗体(美国Santa Cruz公司),ALP染色试剂盒(美国Sigma公司)。原代骨细胞培养基配制:α-MEM,加5%胎牛血清、5%小牛血清、1%青霉素和链霉素。IDG-SW3诱导培养基配制:α-MEM,加10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素,50 μg/mL维生素C、4 mmol/L β-磷酸甘油。MLO-Y4培养基配制:α-MEM,加2.5%胎牛血清、2.5%小牛血清、1%青霉素和链霉素。

1.4 细胞的分离与培养

1.4.1 原代骨细胞分离与培养 按文献[6, 10-12]分离骨细胞的方法进行综合和改良。3.5 cm培养皿预先用Ⅰ型鼠尾胶原(0.15 mg/mL)铺板。分离4只3月龄C57小鼠的双侧股骨和胫骨,将其混合在一起,尽量剥除软组织和骨膜,将长骨近端和远端生长板去除,反复冲洗骨髓腔,将胫骨和股骨干部分用剪刀剪成1 mm左右碎片,用DPBS冲洗后交替用0.1%Ⅰ型胶原酶和5 mmol/L EDTA溶液在培养箱中消化。重复4遍。每步骤20 min,中间用移液器吹打1次。将最后2步消化下来的细胞于200 × *g*转速离心5 min,与骨碎片一起重悬于3.5 cm培养皿中。置于37 ℃、5% CO_2培养箱中。培养24 h后换液1次,此后3~4 d换液1次,培养10 d。

1.4.2 IDG-SW3和MLO-Y4细胞系培养 IDG-SW3和MLO-Y4是目前最常用于研究骨细胞功能的细胞系。前者经分化诱导可模拟成骨细胞后期到成熟骨细胞的过程,诱导后期可高表达骨细胞标志性基因。后者主要模拟早期骨细胞,形态接近骨细胞,主要用于研究骨细胞间以及骨内膜表面的连接[12]。IDG-SW3细胞经分化诱导10 d,每2~3天换液1次。MLO-Y4细胞培养10 d,每3~4天换液1次。

1.5 骨细胞观察和鉴定

1.5.1 细胞形态观察 细胞贴壁后,将培养皿置于倒置显微镜下观察、拍照。

1.5.2 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色 细胞培养10 d,吸去培养基,用DPBS冲洗2次。4%多聚甲醛固定10 min,用DPBS冲洗。按试剂盒说明配制并加入ALP染液,在摇床上轻微摇动30 min。吸除染液后室温自然晾干,加盖玻片封存。

1.5.3 骨钙素(osteocalcin,OC)抗体和E11/gp38抗体免疫荧光染色 细胞培养10 d后取出细胞爬片PBS洗3遍。4%冷的多聚甲醛固定20 min,PBS洗3遍。0.2% Triton X-100通透10 min,PBS洗3遍。血清封闭30 min,PBS洗3遍。一抗4 ℃湿盒内过夜,PBS洗3遍。二抗室温孵育2 h(避光),PBS洗3遍。DAPI染核,然后直接照荧光片。

1.6 qRT-PCR检测骨细胞特异性基因及FGFRs表达

原代骨细胞和两种骨细胞系细胞经培养10 d后采用TRIzol法提取细胞总RNA,所得RNA立即反转录或-70 ℃储存备用。按TaKaRa反转录试剂盒说明书进行逆转录反应。用MX3000P定量PCR仪检测骨细胞和骨细胞系中标志基因牙本质基质蛋白1(dentin matrix protein 1,DMP1)、成纤维细胞生长因子23(fibroblast growth factor 23,FGF23)、骨硬化蛋白(Sclerostin,SOST)的表达水平,以及成纤维细胞生长因子受体1~3(fibroblast growth factor receptor,FGFR1~3)家族在骨细胞中的表达情况。引物序列见表1,内参选用CyclophillinA,扩增条件为95 ℃ 30 s,[95 ℃ 5 s(变性),58 ℃ 20 s(退火),72 ℃ 15 s(延伸)]×40个循环,95 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,95 ℃ 30 s。

表1 qRT-PCR所需引物序列

基因名称	引物序列	片段大小(bp)
CyclophillinA	上游5′-CGAGCTCTGAGCACTGGAGA-3′ 下游5′-TGGCGTGTAAAGTCACCACC-3′	82
SOST	上游5′-CTTCAGGAATGATGCCACAGAGGT-3′ 下游5′-ATCTTTGGCGTCATAGGGATGGTG-3′	133
DMP1	上游5′-GGCTGTCCTGTGCTCTCCCAG-3′ 下游5′-GGTCACTATTTGCCTGTCCCTC-3′	159
FGF23	上游5′-ATGCTAGGGACCTGCCTTAGA-3′ 下游5′-AGCCAAGCAATGGGGAAGTG-3′	100
Fgfr1	上游5′-ATCCGCAGCCTCACATTCAG-3′ 下游5′-CGATAGAGTTACCCGCCAAGC-3′	198
Fgfr2	上游5′-GGGTCTCCGAGTATGAGTTGCC-3′ 下游5′-CGCCTCCTTGGGTTTGTCTTTA-3′	149
Fgfr3	上游5′-TGGTCCAGAGCAGCGAGTTGT-3′ 下游5′-CTTCGTGGGAGGCATTTAGCA-3′	113

1.7 统计学分析

数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 18.0统计软件进行独立样本t检验。

2 结果

2.1 骨细胞形态特征

骨细胞完全贴壁后,呈多树突状或星状,彼此连接(图1)。

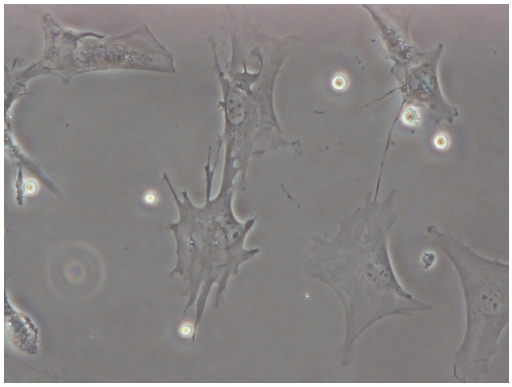
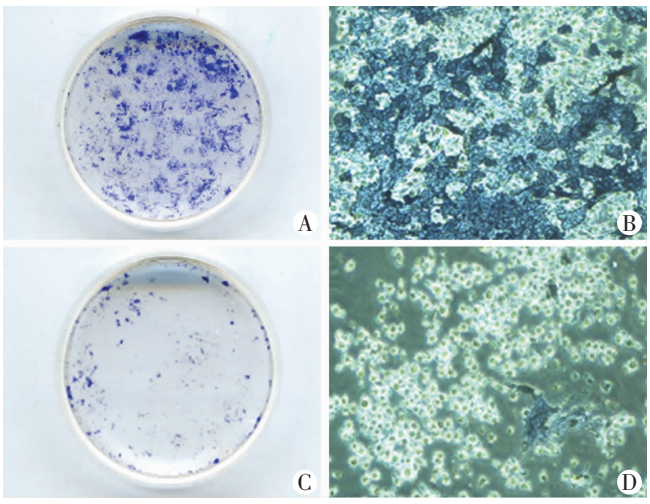


图1 倒置显微镜下骨细胞贴壁后形态 (×200)

2.2 ALP染色

细胞分离重悬液可见3种细胞,分别是成纤维细胞、成骨细胞、骨细胞。严格的分离过程可获得的骨细胞占绝大多数。成纤维细胞(细长梭状,ALP染色阴性),骨细胞(多树突样,ALP染色阴性或弱阳性),成骨细胞(立方形,ALP染色阳性)。ALP的表达和活化是成骨细胞的标志之一,而骨细胞则不表达。因此,ALP染色可初步观察在分离和培养的骨细胞中混杂的成骨细胞数量,以简单鉴别骨细胞的纯度。通过染色观察,那些呈多树突样或星状,而ALP染色阴性的细胞为骨细胞。通过对比观察我们发现,最后2步分离的细胞中(图2A、B),骨细胞的纯度明显高于前3步收集的细胞混合液(图2C、D)。

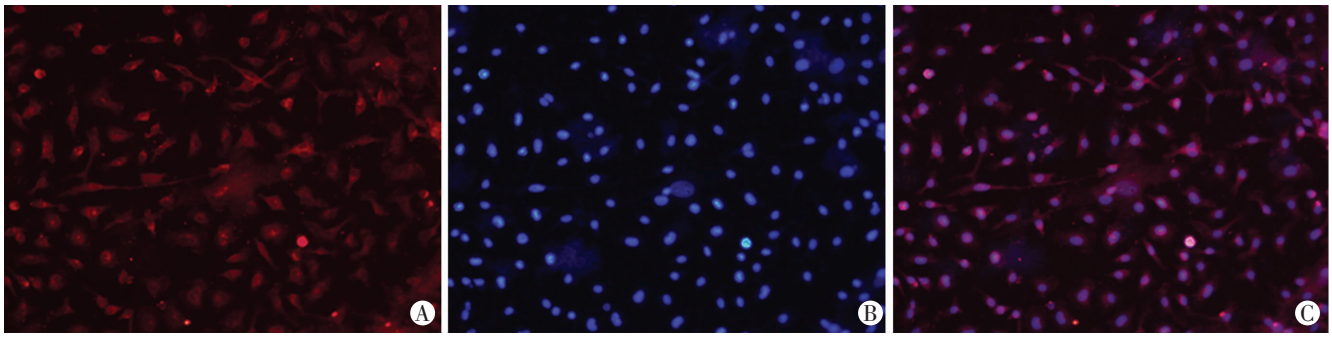


A、B:前3步分离所得细胞;C、D:后2步分离所得细胞;A、C:培养皿观察;B、D:光镜观察(×40)

图2 原代骨细胞培养10 d后ALP染色观察

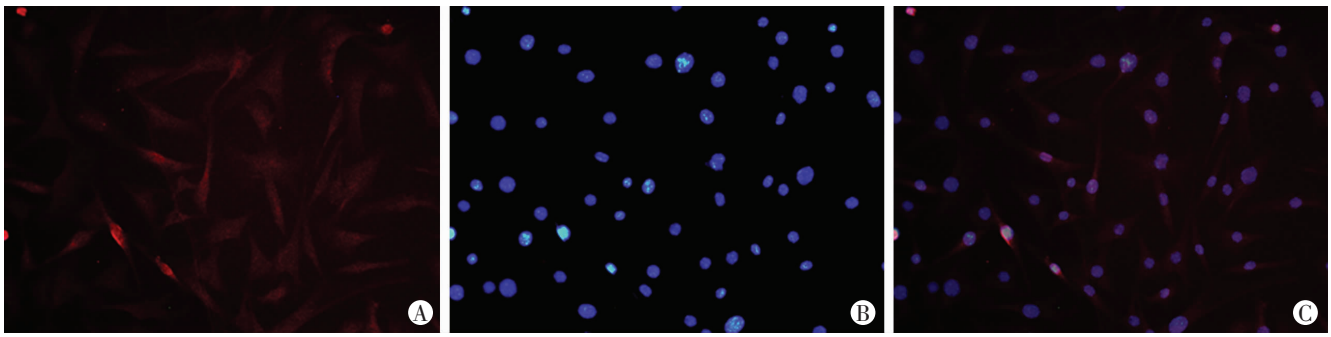
2.3 OC免疫荧光染色

OC是成骨细胞分化标志基因,在骨细胞中也有少量表达,但在成纤维细胞中不表达。OC免疫荧光结果显示我们分离的骨细胞均表达OC,提示其中不含有成纤维细胞(图3)。



A:OC 染色结果;B:DAPI 示细胞核;C:叠加图像

图 3　原代骨细胞培养 10 d 后 OC 免疫荧光染色观察　(×100)



A:E11 染色结果;B:DAPI 示细胞核;C:叠加图像

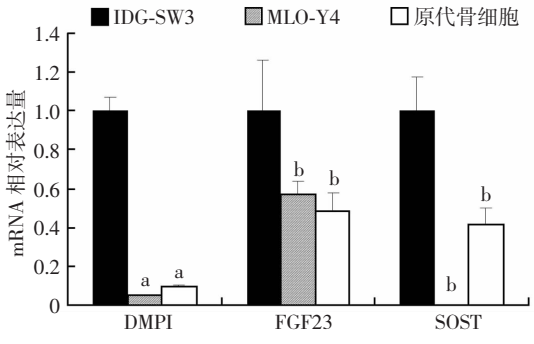
图 4　原代骨细胞培养 10 d 后 E11/gp38 免疫荧光染色观察　(×200)

2.4　E11/gp38 免疫荧光染色

E11/GP38 可用于区分骨细胞与其他细胞(图 4)。培养 10 d 后,经 E11 抗体染色鉴定,骨细胞占细胞总数的 90% 以上。

2.5　骨细胞特异性基因和 FGFR 表达

qRT-PCR 检测 IDG-SW3、MLO-Y4 和原代骨细胞特异基因 DMP1、FGF23 和 SOST 表达。其中诱导后的 IDG-SW3 高表达上述 3 种基因,原代骨细胞同样表达上述 3 种基因,但比 IDG-SW3 表达量少(图 5)。FGFR1 ~ 3 在原代骨细胞中均有表达,定量检测分别为 1.000 ± 0.158、0.596 ± 0.076、0.126 ± 0.048,其中 FGFR1 表达最多,FGFR3 最少,差异有统计学意义($P<0.05$)。



a:$P<0.01$,b: $P<0.05$,与 IDG-SW3 比较

图 5　qRT-PCR 检测原代骨细胞和骨细胞系 DMP1、FGF23 和 SOST 的表达

3　讨论

骨细胞由成骨细胞分化而来,在此过程中体积不断变小,却形成很多突触,呈树枝状或星状,彼此通过突触相互连接,传递信号。还可通过其树突与骨表面的成骨细胞和破骨细胞建立联系,调节其分化,影响骨重建[2]。有研究报道分离骨细胞主要来源于胚胎期或幼年期动物[5-7],与成年期骨细胞功能特点存在差异。此外,颅骨与长骨相比矿化程度低,用动物颅骨分离的骨细胞分泌 ALP 较少,但分泌骨钙素较多[13]。本方法分离成年期小鼠骨细胞,是将利用胶原酶和 EDTA 消化骨细胞的方法进行改良,加强对骨组织消化前的处理,缩短消化过程,减少分离过程中骨细胞的过多死亡,从而获得更多存活骨细胞。

骨细胞在经过鼠尾胶原处理过的培养皿中培养时,骨细胞突触充分伸展。这种充分伸展的突触有利于机械力学信号的传导。贴壁后的骨细胞在镜下呈树枝状或星状,这是骨细胞相较其他细胞特异的形态。但仅依据形态无法特异识别和鉴定骨细胞,还需其他染色鉴定方法。ALP 是成骨细胞分化成熟的标志,在成骨细胞中高表达,在骨细胞中不表达。因此,ALP 染色可用于区分骨细胞和成骨细胞。本实验中染色结果发现,前 3 步分离的细胞经过 10 d 培养,ALP 阳性细胞数明显增加,说明其中成骨细胞所占比例较大。而

后2步分离所得细胞经10 d培养,ALP阳性细胞数量很少,说明其中成骨细胞数量极少,说明最后2步可分离到纯度较高的骨细胞。成骨细胞和骨细胞均有OC表达,而成纤维细胞不表达OC[14-15]。OC染色结果显示本方法分离的细胞均有OC表达,证明本实验分离的细胞中没有混杂成纤维细胞。E11/gp38是骨细胞早期特异表达的蛋白[16]。E11/gp38染色可特异性鉴别骨细胞。经鉴定,本方法分离的细胞中,骨细胞占绝大多数。说明本实验的分离方法在获得足够数量细胞的同时,能保证其中骨细胞的绝对优势比例。

成熟骨细胞特异表达DMP1、FGF23、SOST。本研究通过qRT-PCR检测分离的原代骨细胞上述基因的表达,并与IDG-SW3和MLO-Y4骨细胞系比较,发现3种基因在培养10 d的IDG-SW3中均表达最多,原代骨细胞表达居中,而MLO-Y4系表达最少,甚至检测不到SOST表达。这与Kalajzic等[13]的研究结果一致。说明骨细胞系与原代骨细胞在功能上存在差异,无法全面准确地反映骨细胞功能变化,也从另一个角度说明了分离原代骨细胞进行培养的重要性。FGFs/FGFRs信号对骨骼发育和重建有重要作用[17]。本研究检测发现FGFR1~3在成年小鼠骨细胞中均有表达,说明FGF信号可能参与调控骨细胞的分化、成熟和功能。其中FGFR1的表达最多,推测其信号通路可能对骨细胞的功能影响更大。FGFRs在骨细胞中的表达提示可以通过干预FGFs/FGFRs信号来调节骨细胞功能,从而影响骨稳态。

总之,骨细胞是终末分化的非增殖细胞,因其埋藏于矿化的基质中,给分离和研究工作造成较大困难。很多研究者利用成骨细胞或骨细胞系来进行实验研究,却无法回避其不同的生物学特性造成的不同实验结果。同时,成骨细胞和诸多骨细胞系均为可增殖细胞,这与骨细胞的终末分化特征本身也有很大不同。因此,找到稳定成熟的分离和培养原代骨细胞的方法,能准确深入地研究骨细胞的生物学特性,尤其是其力学传导和调控方面的机制。此外,还可为进一步研究骨细胞对成骨细胞、破骨细胞的分化、功能调控创造条件。

参考文献:

[1] Karsenty G, Oury F. The central regulation of bone mass, the first link between bone remodeling and energy metabolism[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(11): 4795-4801.

[2] Komori T. Functions of the osteocyte network in the regulation of bone mass[J]. Cell Tissue Res, 2013, 352(2): 191-198.

[3] Teti A, Zallone A. Do osteocytes contribute to bone mineral homeostasis? Osteocytic osteolysis revisited[J]. Bone, 2009, 44(1): 11-16.

[4] Bonewald L F. The amazing osteocyte[J]. J Bone Miner Res, 2011, 26(2): 229-238.

[5] Cherian P P, Siller-Jackson A J, Gu S, *et al*. Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin[J]. Mol Biol Cell, 2005, 16(7): 3100-3106.

[6] van-der-Plas A, Nijweide P J. Isolation and purification of osteocytes[J]. J Bone Miner Res, 1992, 7(4): 389-396.

[7] Xiao Z, Zhang S, Mahlios J, *et al*. Cilia-like structures and polycystin-1 in osteoblasts/osteocytes and associated abnormalities in skeletogenesis and Runx2 expression[J]. J Biol Chem, 2006, 281(41): 30884-30895.

[8] 李晓刚, 苏楠, 唐玉彬, 等. FGF2对破骨细胞体外分化以及骨吸收功能的直接调控作用[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(7): 636-639.

[9] 朱莹, 戚华兵, 王权, 等. 构建FGFR3基因沉默慢病毒载体及其对ATDC5细胞增殖和分化的影响[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(11): 1043-1047.

[10] Gu G, Nars M, Hentunen T A, *et al*. Isolated primary osteocytes express functional gap junctions *in vitro*[J]. Cell Tissue Res, 2006, 323(2): 263-271.

[11] van-der-Plas A, Nijweide P J. JBMR anniversary classic. Isolation and purification of osteocytes. A van der Plas A, PJ Nijweide. Originally published in Volume 7, Number 4, pp 389-96 (1992)[J]. J Bone Miner Res, 2005, 20(4): 706-714.

[12] Stern A R, Stern M M, Van-Dyke M E, *et al*. Isolation and culture of primary osteocytes from the long bones of skeletally mature and aged mice[J]. Biotechniques, 2012, 52(6): 361-373.

[13] Kalajzic I, Matthews B G, Torreggiani E, *et al*. *In vitro* and *in vivo* approaches to study osteocyte biology[J]. Bone, 2013, 54(2): 296-306.

[14] Uchihashi K, Aoki S, Matsunobu A, *et al*. Osteoblast migration into type I collagen gel and differentiation to osteocyte-like cells within a self-produced mineralized matrix: a novel system for analyzing differentiation from osteoblast to osteocyte[J]. Bone, 2013, 52(1): 102-110.

[15] Pirraco R P, Cerqueira M T, Reis R L, *et al*. Fibroblasts regulate osteoblasts through gap junctional communication[J]. Cytotherapy, 2012, 14(10): 1276-1287.

[16] Zhang K, Barragan-Adjemian C, Ye L, *et al*. E11/gp38 selective expression in osteocytes: regulation by mechanical strain and role in dendrite elongation[J]. Mol Cell Biol, 2006, 26(12): 4539-4552.

[17] Du X, Xie Y, Xian C J, *et al*. Role of FGFs/FGFRs in skeletal development and bone regeneration[J]. J Cell Physiol, 2012, 227(12): 3731-3743.

(**收稿**:2014-09-21;**修回**:2014-10-12)

(编辑 龙 亮)