DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.046
第24卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 5
2002年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2002

文章编号:1000-5404(2002)05-0603-03

论著

大鼠长骨成骨细胞体外培养形态观察

王 华,黎海芪,杨锡强,瞿 平,刘 瑜 (重庆医科大学儿童医院儿保科,重庆 400014)

提 要:目的 建立生长期大鼠长骨成骨细胞体外培养实验模型并观察其生长及骨化过程。方法 以10周龄Wistar大鼠股骨、胫骨为材料,采用酶分次消化法分离成骨细胞,经DME:F-12加10%胎牛血清的培养基原代和传代培养或含50 μg/ml L-抗坏血酸和10 mmol/L β-甘油磷酸钠的培养基连续培养,追踪观察成骨细胞在体外培养中的增殖及形态变化,并通过Giemsa、ALP及von Kossa染色技术,观察细胞体外基质分泌和骨化过程。结果 ①大鼠长骨成骨细胞具有体内成骨细胞的形态特征,增殖代谢旺盛,其群体倍增时间为78 h。②成骨细胞分泌形成球形和无定形基质。③当给予钙化条件培养时,细胞形成钙化骨基质。④大多数细胞ALP染色呈阳性并与基质的钙化密切相关。结论 培养的生长期大鼠长骨成骨细胞具有成骨细胞的某些生物学行为,为儿童骨生长及调控的研究提供了一种实验模型。

关键词:成骨细胞;细胞培养;骨基质;钙化
中图法分类号:R322.71;R329.24 文献标识码:A

Morphology of *in vitro* cultured osteoblasts derived from growing-rat long bone

WANG Hua, LI Hai-qi, YANG Xi-qiang, QU Ping, LIU Yu (Department of Pediatric Health Care, Children's Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China)

Abstract Objective To establish a culture system for osteoblasts from long bone of growing rats and investigate its growth and ossification process *in vitro*. Methods The tibiae and femora from 10-week-old Wistar rats were isolated and subjected to sequential digestions for cell isolation. Harvested cells were cultured and passaged in a DME:F-12 1:1 medium supplemented with 10% fetal calf serum or in medium with 50 μg/ml ascorbic acid plus 10 mmol/L beta-glycerophosphate. Cell morphology, proliferation and calcification process was observed. Results ①Cells isolated from the rat long bone showed the general morphology of osteoblasts and had population doubling time of 78 h. ② The cells synthesized spherical-like and non-shaped matrices. ③ When the cells were cultured in calcification medium and allow to grow over confluence for 3 weeks, they formed calcified nodules. ④ Most of the cells demonstrated alkaline phosphatase positive, which closely related to matrix calcification. Conclusion Osteoblasts derived from growing rat long bone by enzyme digestion exhibit some biological behaviors of osteoblasts. This simple isolation method provides a valuable model for further study of children's bone growth and regulation.

Key words osteoblasts; cell culture; bone matrix; mineralization

近年来,随着成骨细胞体外培养技术的发展,为深入研究儿童骨骼的生长发育及调控机制提供了可行的手段。但目前国内外大多数实验所采用的成骨细胞均来自胚胎或新生动物的颅盖骨、成骨肉瘤细胞系或克隆化的成骨细胞株。虽然这些细胞都具有多种成骨细胞的表型标志,但成骨肉瘤细胞的功能活性和对成骨调节因子刺激的反应与正常成骨细胞不同[1];而培养的胚胎或新生颅盖骨成骨细胞存在异质性(Heterogeneity)[2],且它们所反映的是异常或未成熟骨的生物学特征。克隆化的成骨细胞株经长期传代后,其生物学性状会发生改变或自发突变,影响实验结果的分析。因此,建立与之相匹配的生长期动物长骨成骨细胞体外培养实验模型,以深入研究儿童骨骼生长发育的调控及细胞生理具有十分重要的意义。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

DME:F-12培养基、L-抗坏血酸、胶原酶Ⅱ型和β-甘油磷酸钠(Sigma),胎牛血清(Hyclone),胰蛋白酶(1:250 Difco进口分装)。NU—4500E型二氧化碳孵箱(美国NuAire),6孔、24孔培养板(丹麦Nunc)。

1.2 成骨细胞的分离及培养

10周龄Wistar大鼠(由重庆医科大学实验动物中心提供)断颈处死,无菌取左侧股骨、胫骨,仔细去除骨髓,并将骨组织剪碎成1 mm^3大小骨粒。0.25%胰蛋白酶10 ml,37 ℃震荡消化20 min,弃上清。30倍体积的0.1%胶原酶(Ⅱ型),37 ℃恒温震荡(60~90次/min)消化90 min。消化液及冲洗液经100目不锈钢筛网过滤,150× g 10 min离心收集细胞,并以1× 10^6/孔细胞浓度接种于含DME:F-12培养液(内含10%胎牛血清、青霉素100 U/ml、链霉素100 μg/ml)的6孔培养板中,于37 ℃、5% CO_2、饱和湿度的CO_2孵箱培养,24 h换液以去除不贴壁的血细胞,以后每2~3 d换液1次。待细胞融合成单层后,用0.25%胰酶+0.02% EDTA消化并以1:2或1:3的比例进行传代。

1.3 细胞活力及增殖观察

台盼蓝拒染法测定细胞活力。按公式:培养时间/3.32(logNt-logNo)计算出群体倍增时间[3](No及Nt分别代表接种及培养t小时后的细胞数,每次计数3~6孔,取其均数)。

1.4 细胞的初步鉴定

1.4.1 形态学观察 倒置显微镜逐日观察细胞生长情况及形态特征。

作者简介:王 华(1963—),男,重庆市人,博士,副教授,主要从事儿童骨骼生长发育及调控方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)63632756
收稿日期:2000-01-05;修回日期:2001-09-24

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.4.2 碱性磷酸酶(ALP)细胞化学染色 采用改良 Gomori 钙-钴法测定细胞内 ALP 活性[4]。每张片计数 500 个细胞,测出 ALP 阳性细胞的百分率。以蒸馏水替代底物 β-甘油磷酸钠的孵育液为空白对照,阳性结果为胞浆内灰、黑颗粒。

1.4.3 基质的分泌及钙化过程 接近融合的细胞给予钙化条件,即含 10% 胎牛血清的 DME:F-12 培养液中加入 50 μg/ml 抗坏血酸、10 mmol/L β-甘油磷酸钠,连续培养 3 周。95% 乙醇 4 ℃ 冰箱内固定 5 min,常规 von Kossa、Giemsa 染色,光镜下观察成骨细胞基质分泌和钙化过程。以小鼠成纤维细胞(3T3)为对照。

2 结果

2.1 细胞活力及增殖

经两次酶消化的细胞用 0.2% 台盼蓝染色,结果 95% 以上的细胞拒染,表明大多数细胞能经受两次酶消化分离过程而成活。原代细胞培养 48 h 后,数量开始增加,随后进入增殖期,其群体倍增时间为 78 h。

2.2 细胞形态和生长的动态观察

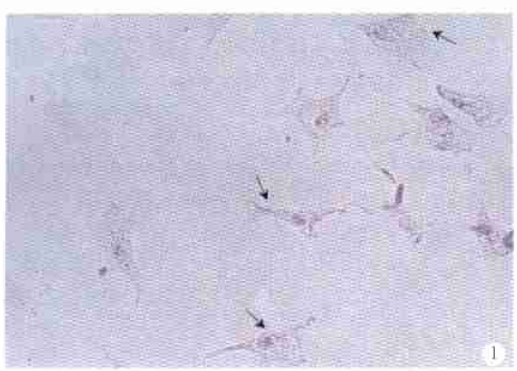
原代细胞培养 24 h 后呈成纤维细胞型贴壁生长,外观呈梭形、三角形、鳞片形,以前两种居多,胞核呈椭圆形,位于中央,轮廓清晰,核内可见 2~3 个核仁。培养 10 d 后,细胞融合成片,分界变得较为模糊,胞体增大,形态则变为短梭形和不规则形,部分细胞聚集成灶。Giemsa 染色见胞浆丰富,随胞质的多少被染为深浅不同的蓝色,内呈细密的网状,胞浆突起形态各异,并常和其他细胞的质膜相连。核大,呈圆形或椭圆形,染红色,染色质颗粒细致而均匀,无明显核分裂像。

2.3 ALP 染色

原代细胞培养的前 5 d ALP 染色阳性率较低,当细胞逐渐融合后 ALP 酶活性增强。取 50%~80% 融合的原代、1 代、2 代细胞,经钙-钴法染色,大部分细胞呈阳性,其阳性率分别为 73.8%、75.4%、76.6%。阳性细胞胞浆内可见灰、黑颗粒,见图 1。空白对照呈阴性。

2.4 基质的分泌和钙化

体外钙化条件下培养的成骨细胞经 Giemsa 染色后,可见球形和均质形两种基质,以球形为主,存在于细胞间或细胞内,见图 2。它可由细胞以顶浆分泌的方式排出胞外,也可通过细胞上类似神经突起的细长胞浆突起送入临近细胞的基质形成区,见图 3。分泌到胞外的基质被成骨细胞包绕,形成类骨质区。较大的球形基质被分解为小的基质囊泡,见图 4 或被另一成骨细胞吞入胞内,见图 5。均质形基质形态与球形基质不同,呈胶质样,具折光性。von Kossa 染色显示细胞间有钙盐沉积,见图 6,表明基质钙化形成骨组织。而给予相同钙化条件培养的成纤维细胞无钙化结节形成。



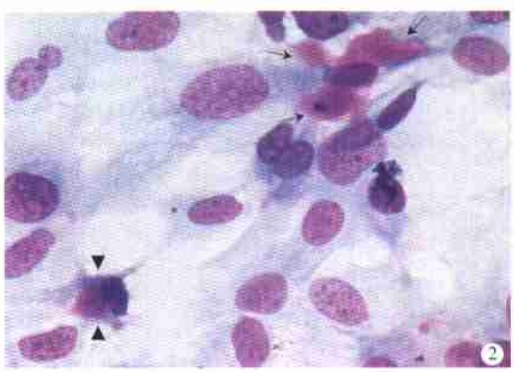


图 1 细胞 ALP 染色,阳性细胞胞浆内可见灰、黑颗粒 (× 200)

Fig 1 Grey and black granules in the cultured cells indicating the presence of alkaline phosphatase (× 200)

图 2 细胞内(▲)和细胞间(→)形成球形和无定形基质 (Giemsa× 400)

Fig 2 Intracellular (▲) and extracellular (→) spherical and formless matrices (Giemsa× 400)



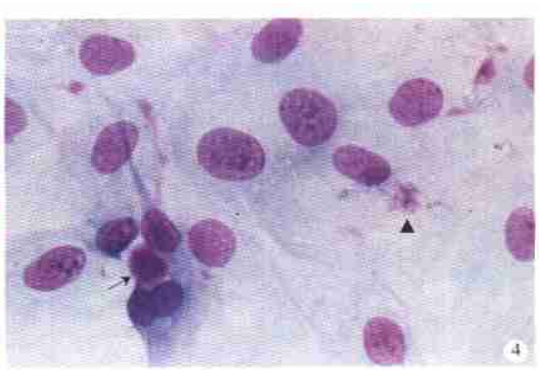


图 3 细胞通过胞浆臂将基质送入另一细胞的基质形成区(→),正在分解的基质(▲) (Giemsa× 400)

Fig 3 Matices transmitted by osteoblastic protrusion from one to another cell (→) and decomposing matrix (▲) (Giemsa× 400)

图 4 基质被成骨细胞包绕形成类骨质区(→)钙化区出现的小囊泡样基质(▲) (Giemsa× 400)

Fig 4 Osteoid zone by matrices surrounded by osteoblasts (→) and vesicle-like matrix in calcification region (▲) (Giemsa× 400)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net




图 5　细胞以虎口状将基质纳入(→) (Giemsa× 400)

Fig 5　Matrix phagocytosed by another cell (→) (Giemsa× 400)

图 6　**von Kossa** 染色, 细胞间黑色的钙盐沉积 (Von Kossa× 40)

Fig 6　Intercellular black sediments of calcium salts, indicating mineralized nodules in extracellular matrices (Von Kossa× 40)

3　讨论

成骨细胞具有成骨潜能是骨组织中的主要功能细胞。高碱性磷酸酶活性, 合成、分泌基质并使基质钙化, 以及对各种激素[PTH、1, 25(OH)$_2$VitD$_3$等] 的刺激产生反应是成骨细胞的主要特征。以往对来自生长期动物长骨的成骨细胞及其生物学行为研究较少, 为此, 本实验以正常生长期大鼠长骨为材料, 采用酶分次消化法进行分离和培养, 结果所获得的细胞显示出成骨细胞的某些生物学特征。在形态上, 细胞呈梭形、三角形和鳞片形等多种形态, 有脱核和拖尾现象, 与其它研究所见到的成骨细胞相似[5]。胞核中核仁明显, 一般可见 2～3 个, 表明细胞具有旺盛的蛋白质合成功能。其群体倍增时间(Population doubling time)为 78 h, 较报道的新生大鼠颅骨成骨细胞的 24～72 h 长[6], 较成人股骨、髂骨的 104 h 短[3], 证明不同种属、不同年龄来源的成骨细胞在体外的生长特性确有所不同。当细胞生长逐渐融合为单层后, 其增殖速度减慢、胞体增大, 转而以分泌骨细胞外基质为主。本实验在细胞培养的早期, 发现 ALP 活性很低, 而当细胞融合、增殖减慢后表达增强, 且传代后无明显改变。说明细胞在体外培养中依然有较高的 ALP 活性并与基质的钙化密切相关, 是成骨细胞体外成骨的前提条件。

当给予细胞钙化条件培养后, 本组细胞能使所分泌的基质发生钙化并形成钙化骨基质。以往认为, 成骨细胞分泌的基质主要是无定形基质和基质小泡(Matrix vesicle), Fournier 等[7] 在植入 OHS-4 成骨细胞株的裸鼠内见到了这两种基质的形成, 并认为成骨细胞分泌基质是其最重要的生物学行为。国内李 芃等[8] 在体外培养人胚颅骨细胞的过程中发现, 除基质小泡和无定形基质外, 成骨细胞还能分泌多种球形的基质, 并推测结构上的不同可能和这些基质的功能有关。本实验也观察到所培养的细胞能形成球形和无定形两种基质。球形基质为质膜所包绕, 分泌出胞后逐渐分解为小的基质囊泡, 或被母体细胞和其它成骨细胞环绕形成类骨质区。从其形态和分泌后的归属来看, 球形基质可能就是基质小泡的前体, 在钙化区裂解为小泡样基质后, 再由这些小泡样基质直接参与钙化过程。此外, 我们还观察到成骨细胞通过其细长的胞浆突起将基质传递, 或以凹陷的口袋状将基质吞入细胞内, 从而参与另一细胞的基质形成。这证明在成骨过程中, 细胞与基质、细胞与细胞之间存在密切的相互协调和作用, 从而调节成骨细胞的功能, 维持骨代谢的平衡。

本实验采用了两次酶消化法分离成骨细胞, 与常用的组织块移行生长法相比, 具有方法快捷、成骨细胞产出高、重复性好等优点, 易满足实验的要求。同时, 为减少酶消化过程对细胞的损伤, 我们对消化时间进行了适当的改进, 结果原代和传代细胞生长良好。此外, 由于培养细胞的供体来自生长期大鼠长骨, 在反映长骨的成骨及骨改建过程中具有一定的代表性。因而本实验为进一步深入研究儿童线性发育和骨生长的调控及机制提供了一个有益的实验模型。

参考文献:

[1] Rifas L, Halstead L R, Scott M J, *et al*. Comparison of secretory products of normal rat osteoblasts and osteogenic sarcoma cells *in vitro*[J]. J Bone Miner Res, 1989, 4(suppl 1): s409—s416.

[2] Nijweide P J, Burger E H, Feijen J H M, Cells of bone: Proliferation, differentiation and hormonal regulation[J]. Physiol Rev, 1986, 66(4): 855—886.

[3] Wergedal J E, Baylink D J, Characterization of cells isolated and cultured from human bone[J]. Pro Soc Exp Bio Med, 1984, 176(1): 60—69.

[4] 杨景山 主编. 医学细胞化学与细胞生物技术[M]. 北京: 北京医科大学与协和医科大学联合出版社, 1990. 42.

[5] 徐荣辉, 朱雅萍, 柴本甫. 胚胎大鼠颅骨分离细胞原代早期体外培养的组织化学观察[J]. 中华骨科杂志, 1990, 10(1): 45—47.

[6] Aubin J E, Heersche J N M, Merrilees M J, *et al*. Isolation of bone cell clones with difference in growth, hormone responses and extracellular matrix production[J]. J Cell Biol, 1982, 92(2): 452—461.

[7] Fournier B, Price P A. Characterization of a new human osteosarcoma cell line OHS-4[J]. J Cell Biol, 1991, 114(3): 577—583.

[8] 李　芃, 王慧明. 人胚成骨细胞体外培养形态和骨化过程初探[J]. 华西口腔医学杂志, 1994, 12(4): 291—294.

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net