胎兔颅骨成骨细胞克隆筛选及鉴定*

唐康来** 吴梅英 杨 柳 卢卫忠 李建福 曹 佳*** 刘胜学*** (第三军医大学附属西南医院骨科)
重庆, 400038

提 要 目的: 筛选胎兔颅骨细胞原代培养中的细胞克隆,建立成骨细胞株。方法: 从胎兔颅骨组织中分离培养颅骨细胞,在此基础上,运用有限稀释法行克隆传代筛选,建立成骨细胞株,并用酶组化、免疫组化及染色体染色等方法予以鉴定。结果: 原代培养的颅骨细胞来源复杂,形态多样;克隆传代筛选的细胞株,细胞形态单一,碱性磷酸酶组化染色呈强阳性,骨形态发生蛋白免疫组化染色呈强阳性,钙红染色显示具有成骨能力;染色体数目形态保持相对稳定。结论: 利用有限稀释和克隆传代培养筛选建立的兔成骨细胞株,生物学性状均一,遗传学性状稳定。

关键词 成骨细胞;细胞培养;细胞克隆;细胞株
中图法分类号 R329.2; R68

成骨细胞培养技术,是研究骨生长代谢和成骨机理的重要手段。自 1964年 Peck[1]首次将胎鼠骨组织所含成骨细胞用于体外培养并获成功后,成骨细胞原代培养方法不断提高和完善,细胞来源更为广泛;而原代细胞培养面临的主要问题有: 培养的成骨细胞群体不均一,细胞污染重,用于实验研究的可比性差。近年来,不少学者用不同的方法克隆培养出生物学性状均一,遗传学性状稳定的细胞株以解决上述问题,并在鼠、人等种属获得成功[2-6];兔的成骨细胞胎株报道较少,而研究骨形成与修复的体内试验大多数采用兔为对象,因此建立与之相匹配的兔的成骨细胞株意义重大。本实验体外分离培养胎兔颅骨细胞后,运用有限稀释和条件培养液法进行克隆培养传代,建立成骨细胞株,并从细胞形态学、酶组化、免疫组化等予以鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料及主要试剂

胎龄为 28 d的日本大耳白兔 (由第三军医大学动物中心提供); PRMI 1640培养液 (Gibco); 胎牛血清 (Gibco); 胶原酶 (Sigma); 胰蛋白酶 (Sigma); 96孔、24孔培养板,青霉素、链霉素、秋水仙素等。

1.2 方法

1.2.1 胎兔原代颅骨细胞分离培养及传代 妊娠 28 d纯种日本大耳白兔, 3%戊巴比妥钠麻醉下剖腹,无菌取出胎兔,切取颅盖骨,置于含有 Hank's液的培养皿中,去净软组织,并将颅骨组织剪碎成 1 mm× 1 mm× 1 mm大小骨粒。采用 PRMI 1640培养液清洗 2次,离心收集沉淀。经 0.1%胶原酶 37℃消化 30min,离心,再加入 0.25%胰蛋白酶, 37℃消化 30 min,离心收集沉淀。再用 PRMI 1640培养液清洗 2次,离心收集沉淀,接种入含有 PRMI 1640培养液 (内含 15%胎牛血清,青霉素 100 u/ml,链霉素 100μg/ml)的培养瓶,置 37℃, 4% CO_2及饱和湿度条件的 CO_2孵箱培养,连续动态观察细胞生长情况。待细胞铺满瓶底后,倾去培养液,加入 Hank's液轻轻荡洗,用 0.25%胰蛋白酶进行消化并按 1∶2或 1∶3的比例予以连续传代培养。

1.2.2 克隆传代筛选培养 连续传代至第 3代,待细胞将长满瓶底,更换新鲜培养液培养 48 h,收集培养液 (即我们的条件培养液)备用。 0.25%胰蛋白酶消化瓶底细胞 10 min左右,弃去消化液,加入少量培养液轻轻荡洗细胞,再加入前面收集的条件培养液并轻轻吹打制成单细胞悬液,稀释至 1个/ml 将单细胞悬液按每孔 1 ml接种入 96孔培养板内,置于 CO_2孵箱培养,连续动态观察细胞生长情况。多于 1个或无细胞的培养孔弃用,单个细胞孔进行连续培养并适时传代。经下面的方法证实为成骨细胞株予以保留,其余弃用。证实为成骨细胞的细胞株予以连续传代培养,并作生物学性状和遗传学性状观察。

1.2.3 细胞的鉴定方法

1.2.3.1 倒置显微镜动态观察 运用倒置显微镜连续动态观察细胞生长及形态特征,并对克隆培养及传代的细胞增殖计数。

1.2.3.2 碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, ALP)细胞化学染色 将 1 cm× 1 cm大小盖玻片预先置入培养瓶 (板)内,待细胞生长在盖片上,按文献[7]方法,采用改良钙钴法进行

* 重庆市重点科技攻关项目基金资助
** 唐康来,男, 30岁,主治医师,讲师,硕士
*** 预防医学系分子毒理实验室

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

ALP染色,阳性细胞浆内可见灰褐色的细小颗粒,每群细胞每代随机取 2张玻片,每张计数 500个细胞,测出 ALP阳性细胞的百分率。

1.2.3.3 骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic protein, BMP)免疫组化染色 按文献[8]的方法制片,用 BMP-MCAb免疫细胞化学法染色,显示细胞内 BMP存在部位(BMP单克隆抗体由四医大杨连甲教授惠赠,免疫组化药盒为华美公司提供)。阳性细胞浆内可见棕黄色颗粒,胞核空染,阳性细胞计数方法按文献[8]。

1.2.3.4 钙红染色 按文献[8]的方法制片,分别对原代及连续传代细胞和克隆细胞进行钙染色,了解细胞的成骨及钙化能力,钙呈红色,其他组织细胞呈深浅不同的粉红色。

1.2.3.5 染色体分析 原代及连续传代得到的细胞和克隆传代建立的细胞株按文献[8]方法进行细胞染色体染色,每种细胞任取 50个细胞行染色体计数。

2 结果

2.1 相差显微镜下细胞生长及克隆形成的动态观察

镜下观察发现:原代细胞贴壁时间长短不一,一般在 4~48 h;颅骨细胞多数贴壁,少数不贴壁。原代细胞群中细胞形态差异较大,有鳞片形、多角形、星形、长梭形、短梭形及小圆形等。经连续传代培养,鳞片形、多角形、星形细胞比例逐渐增多,其他形态细胞数目逐渐减少。克隆传代后,单个细胞在条件培养液中生长良好,细胞增殖分裂呈克隆样生长,每个克隆的细胞形态基本一致。随着传代次数增加,其细胞形态仍保持相对稳定。细胞增殖速度与未克隆传代细胞相比最初 6代比较快,特别是 3~6代尤为明显,到 10代后细胞增殖速度大为降低。克隆筛选建立的细胞株寿命明显不如原代连续传代培养的细胞系长。克隆筛选建立的细胞株传代到 12代就不再增殖,而原代连续传代培养的细胞可传至 20代。

2.2 细胞的生物学性状观察

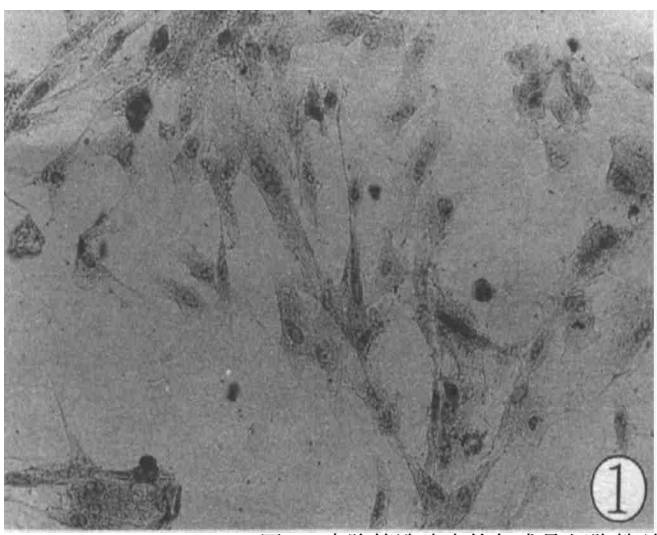
2.2.1 原代细胞连续传代的生物学性状观察

2.2.1.1 ALP细胞化学染色显示 培养的原代细胞部分呈强阳性,比例大约为 35%左右,阳性细胞的形态多为鳞片形、多角形及星形,阴性细胞形态多为梭形和圆形。随着传代次数的增加阳性细胞率也逐渐增加,第 1、2、3、4代分别为 40.6%、47.8%、54.3%和 61.7%。

2.2.1.2 BMP免疫组化染色 阳性细胞浆内分布着棕黄色颗粒,胞核空染;同样,阳性细胞也多见于多角形、鳞片形和星形细胞。随着代数增加,其阳性率也逐渐增多。第 1代至第 4代的阳性细胞比率大约为 34.9%、39.4%、46.9%、55.1%和 62.3%,与碱性磷酸酶阳性细胞率呈正相关。

2.2.1.3 原代及连续传代的各代细胞均具有成骨能力,能形成钙化中心。

2.2.2 克隆传代建立的细胞株生物学性状观察 克隆传代的细胞株从形态学上首先去除梭形及圆形细胞,保留多角形、鳞片形和星形细胞株。再分别用 ALP细胞化学染色和 BMP免疫组化染色排除阴性细胞株,保留二者均为阳性的细胞株,即为我们筛选的成骨细胞株,见图 1、2。经克隆传代的成骨细胞株 ALP细胞化学染色和 BMP免疫组化染色阳性率为 100%。随着传代次数的增加,其阳性率逐渐减低。克隆传代的成骨细胞同原代及连续传代细胞一样,具有成骨能力,能形成钙化中心,见图 3。



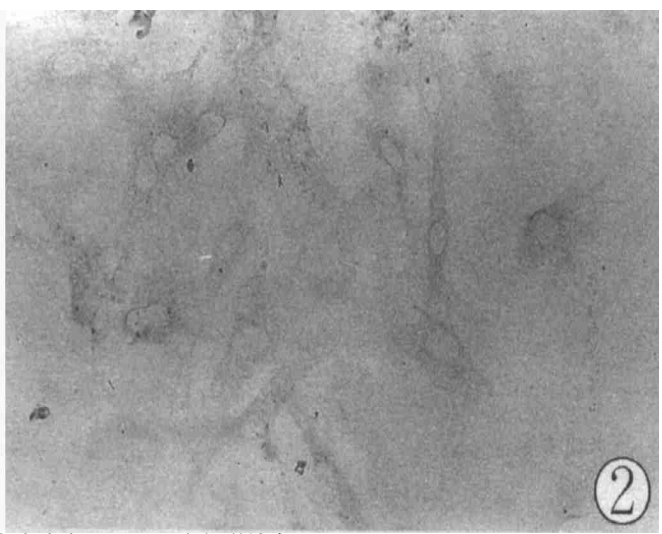


图 1 克隆筛选建立的兔成骨细胞株碱性磷酸酶(ALP)细胞化学染色 (×200)

Fig 1 Alkaline phosphatase staining of the cloned rabbit osteoblatic strain (×200)

图 2 克隆筛选建立的兔成骨细胞株骨形态发生蛋白(BMP)免疫组化染色 (ABC×200)

Fig 2 BMP staining of the cloned rabbit osteoblatic strain (ABC×200)

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

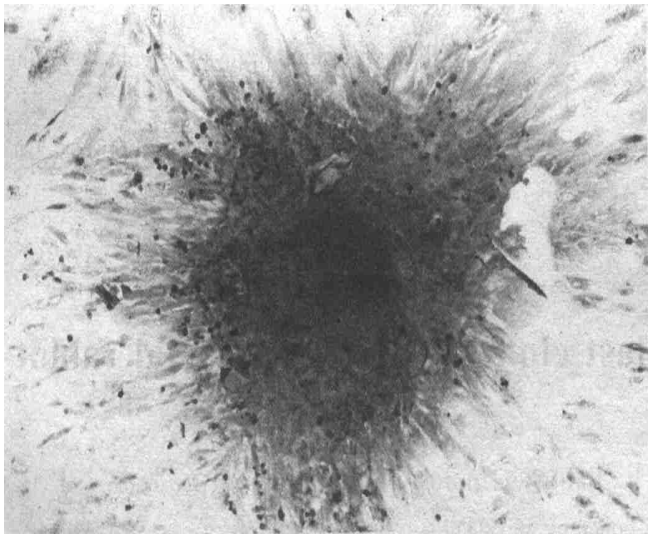


图 3　克隆筛选建立的兔成骨细胞株钙红染色　(× 200)

Fig 3　Calcipexy staining of the cloned rabbit osteoblatic strain　(× 200)

2.3　细胞的遗传学观察

染色体染色显示克隆筛选建立的成骨细胞株为二倍体细胞,染色体数目恒定,缺失、短臂及丢失罕见。但随着传代的延续,其染色体缺失、短臂及丢失也在逐渐增加。

3　讨论

胎兔颅骨组织原代分离培养的细胞群成分复杂多样,有原始的间充质细胞、成纤维细胞、成软骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、骨髓细胞、甚至还有血细胞,不便于成骨细胞生物学特性的观察。原代培养及连续传代培养过程中,我们用轻微振荡加冲洗的方法去除非贴壁细胞如:血细胞和部分骨髓细胞;用酶消化的方法可以除去大部分成纤维细胞;另外,在培养过程中许多幼稚的间充质细胞,成纤维细胞部分向成骨细胞转化。这样,随着培养时间的延长,成骨细胞的比例也就逐渐增多,在我们的实验中得到了有力的证实。

目前研究成骨细胞生物学特性面临的一个突出问题是:如何排除细胞污染,建立稳定均一的细胞株。许多学者运用克隆传代技术已克隆出多种细胞株如 MC3T3E, CRP1030, CPR4/7等。其方法大致有:有限稀释法和软琼脂克隆法[2-6,9]。影响有限稀释法进行克隆传代成功的关键在于如何使单一细胞在培养基中存活并增殖。我们通过实验摸索,利用具有丰富营养成分的条件培养液,培养单一细胞是一种较好的方法,这种条件培养液含有细胞生长、分化及增殖所需的各种成分,为克隆传代的单细胞提供了相对稳定的外环境。实验证明,运用有限稀释和条件培养液法克隆传代筛选建立成骨细胞株是一种非常有效的方法。克隆筛选传代的细胞株是否为成骨细胞,必须根据其生物学特性和遗传学性能进行鉴定。成骨细胞的生物学特性有:① 成骨细胞生长活跃,形态以鳞片形、多角形、星形为主,少量也有短梭形;② 具有强碱性磷酸酶活性;③ 特异地合成和分泌骨形态发生蛋白;④ 有合成、分泌骨钙素及成骨能力[10-12]。克隆传代的细胞,遗传学性状稳定,自发突变率低。我们克隆传代的细胞株具备上述特点。兔成骨细胞株的建立将会对骨组织工程及骨科的基础研究具有巨大推动作用。然而这种细胞株经过长期传代后,细胞某些生物学性状会发生改变或自发突变,且传代具有有限性,即传至一定代数后,细胞会发生凋亡、坏死。细胞发生自发突变的分子机理以及如何建立一种稳定的、永生的兔成骨细胞株用于骨组织工程研究,将是我们面临的新课题。

参考文献

1　Peck W A, Birge S J, Susan J R, *et al*. Bone cells: biochemical and biological studies after enzyman isolation. Science, 1964, 146(3): 1476

2　Anselme K, Hardouin P. Cell culture and orthopedic surgery. I. Principles, method fundamental applications. Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot, 1996, 82(8): 709

3　Anselme K, Hardouin P. Cell culture and orthopedic surgery. Ⅱ. Medical application. diagonsis, biomaterials evalution, therapy. Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot, 1996, 82(8): 724

4　Vilamitjana A, Bareille R J, Rouais F, *et al*. Human bone marrow stromal cells express an osteoblastic phenotype in culture. *In Vitro* Cell Dev Biol, 1993; 29A(2): 99

5　Hofstetter W, Guenther H L, Stutze A, *et al*. Establishment and characterization of two immortalized cell lines of the osteoblastic lineage. J Bone Miner Res, 1996, 6(6): 609

6　Nolan P C, Nicholas R M, Mulholland B J, *et al*. Culture of human osteoblast on demineralised human bone. J Bone Joint Surg Br, 1992, 74(2): 284

7　Ashton B A. Characterization of cells with high alkaline phosphatase activity derived from human bone and marrow: preliminary assessment of their osteogenicity. Bone, 1985, 6(3): 313

8　鄂　征.组织织培养和分子细胞学技术.第 2版.北京:北京出版社, 1997. 164-167

9　王卫华.成骨细胞体外培养方法研究进展.国外医学:口腔医

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

学分册, 1996, 23(5): 287
10 Wada Y, Kataoka H, Yokose S, *et al*. Changs in osteoblast phenotype during differentiation of enzymatically isolated rat calvaria cells. Bone, 1998, 22(5): 479
11 Wergedal J E, David J B. Characterization of cells isolated and cultured form human bone. Proc Soc Exp Biol Med, 1984, 176(1): 60
12 Wlodaski K H. Properties and origin of osteoblasts. Clin orthop, 1990, 252(3): 276

(收稿: 1999-02-26;修回: 1999-07-22)
(编辑 张大春)

Screening and identification of osteoblast clone derived from fetal rabbit calvarial bone *in vitro*

Tang Kanglai, Wu Meiying, Yang Liu, Lu Weizhong, Li Jianfu, Cao Jia, Liu Shengxue (Departiment of Orthopaedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract **Objective**: To screen and identify the osteoblastic strain derived from fetal rabbit calvarial bone. **Methods**: Routine cell isolation and culture techniques were used to screen the osteoblastic clone from fetal rabbit calvarival cells. Morphology of cells and chromsome, immunohistochemical technique, were used to identify the cell strain. **Results**: The morphology of primary cells cultured *in vitro* were diversed, suggesting a multiple origin of the cloned cells. The morphology of the cloned cells were uniform. ALP stain and BMP immunochemical stain were strong positive. Calcipoxy stain showed the cell line had osteogenetic property. Chromosome diploid and kept in steady state. **Conclusion**: The osteoblastic strain has the morphological, biological genetical characteristics of osteoblasts.

Key words osteoblasts; cell culture; cell strain; cell clone

(上接 566页)

剂能做 500张切片,而 SP试剂可做切片 900张。由此可见三种试剂和方法在以上几方面有着明显差异和不同,见表 1。

表 1 ABC LSAB和 SP三者的比较

项目	稀释度	阳性率(%)			背景染色	时间(h)	属性	价格
		+	++	+++				(100μl)元
ABC	1∶150	3	97	0	+(-)	4	有	350
LSAB	1∶250	0	95.5	4.5	(-)	1.5	无	225
SP	1∶450	0	94.7	5.3	(-)	1.5	有	235

+: 弱阳性; ++: 阳性; +++: 强阳性

3 讨论

实验结果初步显示 SP法, LSAB法在敏感性,背影清晰度及稀释度等均优于 ABC法。 ABC复合物是将过氧化物酶结合在生物素上,再将该生物素过氧化物酶结合物与过量的卵白素(Avidin)反应而成[2]。 ABC中 A系来自鸡蛋白,它的等电点为 10.5,与组织间有较大的静电相互作用。其糖位结合点易与组织中的某些蛋白结合,尤其某些组织和细胞本身含有生物素者更易结合,另外含过剩标记物的 ABC复合物常带有负电荷,能粘连到组织的带阳电荷的部位。因而它能经常显示出非特异性染色。而 SP和 LSAB是从一种链霉素中分离的蛋白质,不含糖基链[1,3]。分子量为 60 kd,等电点为 5.6~6.7,接近中性,几乎不与组织中的内源性凝集样物质发生非特异性结合。由于其本身的分子量小, ABC复合物分子量大,因而它穿透组织的能力比 ABC复合物大,反应速度快。这即是 SP LSAB不易发生非特异染色,背影更加清晰及稀释度更高的原因。

通过大肠癌石蜡切片中 P21蛋白免疫组化检测,从稀释度、敏感性、非特异性染色、属性和价格等方面对 ABC、LSAB和 SP三种方法进行了比较,结果显示 SP法优于 LSAB和 ABC法而 LSAB法则优于 ABC法。该结果对实际工作中有一定指导意义。

关键词 免疫组化; P21;抗体
中图法分类号 R392-33

参考文献

1 施作榕.链霉菌亲生物素蛋白-生物素酶标免疫组化染色法的初步研究.中国免疫学杂志, 1986, 2(3): 169
2 刘彦仿.免疫组织化学.北京: 人民卫生出版社, 1990. 84~86
3 染英杰,凌启波.一种快速高敏感的免疫组织化学染色-LSAB法.中华病理学杂志, 1993, 22(6): 369

(收稿: 1998-12-05;修回: 1999-03-31)
(编辑 陈聪连)

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