

## 体外应用不同方法培养破骨细胞的实验对比研究

董伟,冯晓洁,戚孟春\*,梁永强,彭宏峰

(河北联合大学口腔医学院,河北唐山 063000)

**[摘要]** 目的:研究体外应用不同培养方法对所生成的破骨细胞数量及功能的影响。方法:体外采用3种方法培养破骨细胞:A组小鼠骨髓细胞中加入10 ng/ml 巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)培养24 h,未贴壁细胞30 ng/ml M-CSF预诱导3 d后,50 ng/ml M-CSF + 100 ng/ml 核因子 $\kappa$ B受体活化因子配体(RANKL)继续诱导;B组小鼠骨髓细胞与小鼠颅骨成骨细胞以10:1的比例混合培养,加入 $1 \times 10^{-6}$  mol/L 前列腺素E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)和 $1 \times 10^{-8}$  mol/L 维生素D<sub>3</sub> (VitD<sub>3</sub>);C组小鼠单核巨噬细胞系RAW264.7中加入100 ng/ml RANKL诱导培养。检测每组细胞抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色情况及牙本质磨片吸收陷窝情况,Real-time PCR检测各组破骨细胞NFATc1、c-Fos表达情况。结果:各组细胞均有TRAP阳性多核破骨细胞生成,并在牙本质磨片上形成吸收陷窝。B组所形成的破骨细胞数量最多,C组次之,A组最少;B组骨吸收陷窝数目最多,陷窝总面积最大,A组其次,C组最差;B组NFATc1、c-Fos表达高于C组及A组,A组表达最差。结论:3种培养破骨细胞的方法相比较,B组在破骨细胞分化和吸收功能方面优于A、C组。A、C组相比较,A组培养的破骨细胞骨吸收功能更强,C组所培养的破骨细胞分化更佳。

**[关键词]** 破骨细胞;抗酒石酸酸性磷酸酶;骨吸收陷窝;核因子 $\kappa$ B受体活化因子配体;活化T细胞核因子1蛋白

**[中图分类号]** Q813.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)04-475-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20130411

### The different methods of osteoclast culture *in vitro*

Dong Wei, Feng Xiaojie, Qi Mengchun\*, Liang Yongqiang, Peng Hongfeng

(College of Stomatology, Hebei United University, Tangshan 063000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the influence of osteoclast generation and function in different methods of osteoclast culture *in vitro*. **Methods:** We used 3 methods of osteoclast culture *in vitro*; the group A, 10 ng/ml M-CSF was added in mice marrow cell for 24 h. Cells which not adhere to the surface were pre-induction with 30 ng/ml M-CSF for 3 d, and then 50 ng/ml M-CSF + 100 ng/ml RANKL were added; the group B, mix culture mice marrow cell with mice osteoblast on 10:1, and  $10^{-6}$  mol/L PGE<sub>2</sub> and  $10^{-8}$  mol/L VitD<sub>3</sub> were added; the group C, RAW264.7 was added with 100 ng/ml RANKL to inducement. Osteoclastogenesis and their resorption function were examined by TRAP staining and scanning electron microscope (SEM) observation of dentin resorption lacunae. The gene expressions of NFATc1 and c-Fos were also detected by Real-time PCR. **Results:** TRAP positive multinuclear cells were observed and resorption lacunae were formed in each group. However, the group B showed more TRAP positive multinuclear cells and larger amount of resorption lacunae than the group A and C. The group C showed more TRAP positive multinuclear cells but less amount of resorption lacunae than the group A. Real-time PCR detection also showed that the gene expressions of NFATc1 and c-Fos were higher in the group B than the group A and C. **Conclusion:** As the comparison of three methods of osteoclast culture, the group B is better than the group A and C in osteoclastogenesis and resorption function. The group A is better than the group C in the resorption function of osteoclast, but the group C is better than the group A in osteoclastogenesis.

**[Key words]** osteoclast; tartrate-resistant acid phosphatase; bone resorption lacunae; RANKL; NFATc1

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(4): 475-479]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81270965);河北联合大学科学研究基金(z201233)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: qimengchun@163.com

骨质疏松病理表现为骨改建生理平衡的破坏,骨吸收大于骨形成,导致人体骨骼量与量的进行性减少<sup>[1]</sup>。而惟一具有骨吸收功能的破骨细胞(osteoclast, OC)是参与骨改建的重要效应细胞,对于破骨

细胞及其作用药物的深入研究将有利于骨质疏松症等疾病治疗效果的改善。其中,成熟完善的破骨细胞培养技术将是上述系列研究的基础和前提。本研究将中外研究领域所用的破骨细胞培养方法加以比较,通过对比破骨细胞分化和功能的相关检测来探索破骨细胞培养的最佳途径,为后续破骨细胞及其作用药物的深入研究打下良好的基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

$\alpha$ -MEM 培养基(Gibco 公司,美国);抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色试剂盒、PGE<sub>2</sub>、VitD<sub>3</sub> (Sigma 公司, 美国);核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand, RANKL, Biovision 公司, 美国);红细胞裂解液(北京博奥森);扫描电镜(S-4800, HITACHI 公司, 日本);Rotor-Gene 3000 荧光定量 PCR 仪(Gene Company Limited 公司, 美国);SPF 级雄性 BALB/c 小鼠购自北京维通利华;RAW264.7 小鼠单核巨噬细胞系购自中国肿瘤研究所。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 破骨细胞的培养及实验分组

胰酶消化法培养小鼠颅骨成骨细胞,培养至第3代备用。骨髓细胞获取:断颈处死 4 周龄雄性 SPF 级 BALB/c 小鼠, 无菌条件下切取小鼠双侧股骨及胫骨, PBS 缓冲液清洗后去掉两侧干骺端, 用  $\alpha$ -MEM 培养液(含 100 U/ml 青霉素, 100  $\mu$ g/ml 链霉素, 10%胎牛血清)冲洗骨髓腔获得骨髓细胞, 制备细胞悬液, 红细胞裂解液裂解, 重悬备用。实验分为 3 组, 每组培养板事先放置盖玻片及牙本质磨片。

A 组(对照组):上述重悬液中加入 10 ng/ml M-CSF 培养 24 h, 收集未贴壁细胞, 以  $1 \times 10^5$  个/孔的细胞密度种入 48 孔培养板中, 30 ng/ml M-CSF 预诱导 3 d 后, 50 ng/ml M-CSF + 100 ng/ml RANKL 继续诱导。

B 组:将上述重悬液与胰酶消化法培养的第 3 代小鼠颅骨成骨细胞以 10:1 的比例混合, 以  $1 \times 10^5$  个/孔的细胞密度接种于 48 孔培养板中, 在含有  $1 \times 10^{-6}$  mol/L PGE<sub>2</sub> 和  $1 \times 10^{-8}$  mol/L VitD<sub>3</sub> 的  $\alpha$ -MEM

培养液中培养。

C 组:小鼠单核巨噬细胞系(RAW264.7)以  $1 \times 10^4$  个/孔密度接种于 48 孔培养板中, 加入含有 100 ng/ml RANKL 的  $\alpha$ -MEM 培养液来诱导破骨细胞生成。

#### 1.2.2 抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) 染色

各组细胞培养至第 7 天, 收获细胞并按 TRAP 染色试剂盒操作步骤进行 TRAP 染色, 显微镜下观察, 计算破骨细胞数目。方法为 100 倍下随机选取每孔细胞爬片上 5 个视野, 计算 TRAP 染色阳性细胞(细胞核  $\geq 3$  个, 细胞质内出现棕褐色颗粒)数目, 5 个视野的平均数代表该培养孔的破骨细胞数目。

#### 1.2.3 牙本质磨片检测

取各组培养至第 9 天的牙本质磨片, 2.5%戊二醛 4 $^{\circ}$ C 固定 7 min, 1 mol/L 氢氧化胺中以 50 Hz 超声清洗 5 min, 再经蒸馏水超声清洗 5 min; 共 3 次; 随后 2.5%戊二醛固定 2 h, 1%锇酸固定 2 h, 乙醇逐级脱水, 醋酸异戊酯置换, 二氧化碳临界点干燥, 镀金, 扫描电镜(HITACHI S-4800)观察吸收陷窝。每孔牙本质磨片上随机选取 5 个视野(500 倍), 用医学数码图像分析系统 Med6.0 测量 5 个视野吸收陷窝总数目及总面积, 计算平均值。

#### 1.2.4 Real-time PCR 检测

各组培养至第 7 天, 收获各组细胞, TRIzol 提取总 RNA; 按照 Real-time PCR 试剂盒说明书将 RNA 逆转录合成 cDNA。在 Rotor-Gene 3000 荧光定量 PCR 仪上进行实时定量 PCR 检测, 所用引物见表 1。反应条件为:95 $^{\circ}$ C, 15 s; 60 $^{\circ}$ C, 40 s; 72 $^{\circ}$ C, 15 s; 共 50 个循环。每组细胞检测均重复 3 次。检测时 PCR 仪采集每一反应管中荧光强度的变化, 并绘制动力学曲线, 得出样品荧光强度增加到阈值时的平均 Ct 值, 由分析软件自动计算出待测基因与管家基因 GAPDH 比较的  $\Delta$ Ct 值, 进而计算出与对照组  $\Delta$ Ct 值比较的  $\Delta\Delta$ Ct, 并依据公式基因相对水平 =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算各组细胞与对照组比较待测基因 NFATc1、c-Fos 基因的相对水平。

### 1.3 统计学方法

TRAP 阳性细胞数目、吸收陷窝数目及陷窝面

表 1 实时定量 PCR 引物

Table 1 Primers used in real-time PCR

基因	上游引物	下游引物
NFATc1	5'-CTCACACAGGGCTCACTATG-3'	5'-TTCTTCTCCCGATGTCCGT -3'
c-Fos	5'-CCGAAGGGAACGGAATAAGA-3'	5'-TCTGGGAAGCCAAGGTCAT -3'
GAPDH	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAG-3'	5'-TCCACCAC CCT GTT GCTGTA-3'

积、Real-time PCR 检测结果用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。统计软件 SPSS13.0 进行单因素方差分析(One-way ANOVA),  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TRAP 染色

细胞培养至第7天, 各组均形成 TRAP 染色阳性多核破骨细胞(图1), 但各组间在破骨细胞生成数量上存在显著性差异: B 组所形成的破骨细胞数量最多, C 组次之, A 组最少( $P < 0.01$ , 表2)。提示各种培养方法在破骨细胞生成上的比较, B 组最佳, C 组其次, A 组最差。

### 2.2 牙本质吸收陷窝观察及定量分析

细胞培养第9天, 扫描电镜下各组牙本质磨片上出现不同程度的吸收陷窝(图2); 各组吸收陷窝计数及陷窝面积见表2。各组相比较, B 组吸收陷

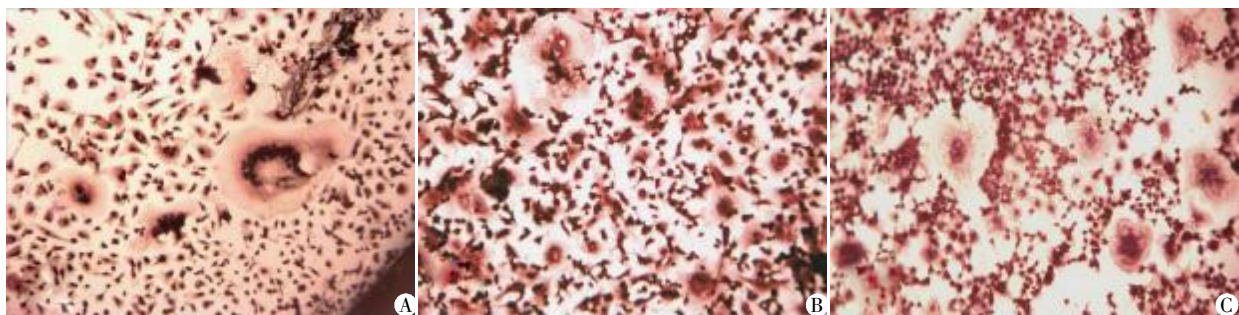
窝数目最多, 陷窝总面积最大, A 组其次, C 组最差( $P < 0.01$ )。这说明, 各种培养方法在吸收功能上比较的结果, B 组生成的破骨细胞骨吸收功能最佳, A 组次之, C 组最差。

### 2.3 Real-time PCR 检测

经 Real-time PCR 检测, 各组 NFATc1、c-Fos 基因 mRNA 水平经过换算, 其相对浓度见图3。B 组、C 组与 A 组相比 NFATc1 相对浓度平均值分别为  $8.236 \pm 0.262$ 、 $2.513 \pm 0.488$  ( $P < 0.01$ ), c-Fos 相对浓度平均值分别为  $4.231 \pm 0.421$ 、 $2.047 \pm 0.365$  ( $P < 0.01$ )。上述结果说明, B 组 NFATc1、c-Fos 表达高于 C 组及 A 组, A 组表达水平最低。

## 3 讨论

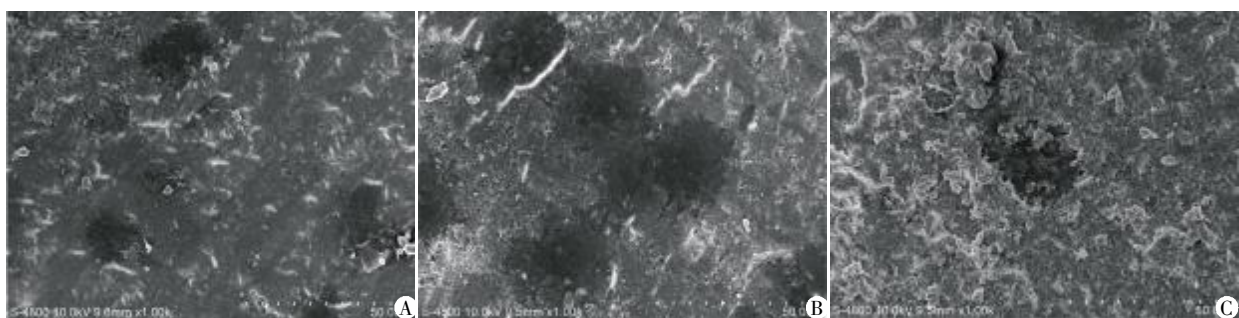
破骨细胞为现阶段行使骨吸收功能的惟一效应细胞, 其与许多骨骼疾病如骨质疏松症、类风湿



A: A 组; B: B 组; C: C 组。

图1 各组细胞培养至第7天破骨细胞生成情况(TRAP染色, ×200)

Figure 1 Osteoclastogenesis in each groups on the 7th day of culture (TRAP staining, ×200)



A: A 组; B: B 组; C: C 组。

图2 培养至第9天各组细胞牙本质磨片吸收陷窝(扫描电镜, ×1 000)

Figure 2 Resorption lacunae formed on dentin slices on the 9th day of culture (SEM, ×1 000)

表2 各组 TRAP 阳性破骨细胞计数及牙本质磨片吸收陷窝计数和陷窝面积

Table 2 The number of TRAP (+) osteoclast, the number and size of resorption lacunae formed on dentin slices

分组	TRAP 阳性细胞计数(个)	吸收陷窝计数(个)	吸收陷窝面积( $\mu\text{m}^2$ )
A 组	$20.4 \pm 2.9$	$22.6 \pm 2.1$	$2\ 315.4 \pm 58.0$
B 组	$41.0 \pm 2.9^*$	$27.8 \pm 1.6^*$	$2\ 898.8 \pm 390.5^*$
C 组	$30.4 \pm 2.2^*$	$8.4 \pm 2.1^*$	$1\ 079.6 \pm 85.1^*$

与 A 组比较, \* $P < 0.01$ 。

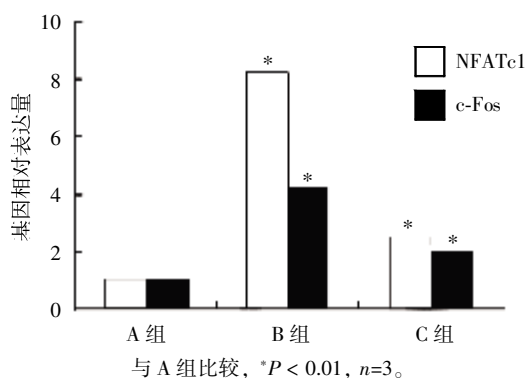


图3 Real-time PCR检测NFATc1、c-Fos基因表达

Figure 3 The detection of the gene expression of NFATc1 and c-Fos by Real-time PCR

性关节炎、Paget's病、多发性骨髓瘤、恶性肿瘤的溶骨性骨转移等的发生发展密切相关,其病理表现为破骨细胞分化增殖活跃及骨吸收功能的亢进。因此,破骨细胞的分化功能及相关药物对破骨细胞的影响等成为当代科学研究领域的热点;而成熟完善的破骨细胞培养技术则成为破骨细胞研究领域的基础。随着科研的深入,产生了多种破骨细胞的培养方法并成功获得了具备骨吸收功能的多核破骨细胞<sup>[5-6,8]</sup>。

现阶段研究认为,破骨细胞是由造血系统的单核巨噬细胞融合而来,一些基因的序贯表达对破骨细胞分化、成熟以及功能的发挥起着极其重要的调控作用,如NFATc1、M-CSF、c-Src、c-Fos、NF-κB等<sup>[2]</sup>。而上述基因的序贯表达需要分子通路的激活才能实现,其中RANK/RANKL信号通路、M-CSF信号通路是破骨细胞分化成熟及功能活化最为重要的通路<sup>[9]</sup>。M-CSF由间质细胞/成骨细胞、T淋巴细胞在骨微环境中生成,可刺激造血干细胞向单核/巨噬细胞系分化,利于破骨细胞前体细胞的增殖并促进已分化的破骨细胞存活;RANKL存在于成骨细胞及其前体上,是成骨细胞—破骨细胞膜之间信息转导的启动蛋白,在RANKL的刺激下,相关信号分子c-Fos、NFATc1、NF-κB等通过序贯表达(NF-κB细胞核异位、NFATc1自发扩增、c-Fos与c-Jun结合并激活),最终促进破骨细胞的生成<sup>[3,10]</sup>。

本实验采用已被证实培养出成熟破骨细胞的3种培养体系:小鼠骨髓单核细胞诱导法<sup>[7]</sup>、小鼠骨髓细胞+成骨细胞诱导法<sup>[8]</sup>、小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7)诱导法<sup>[6]</sup>,均成功获得了成熟的具有骨吸收功能的破骨细胞。但3种方法在破骨细胞分化生成数量及骨吸收功能上存在差异,其中小鼠骨髓

细胞+成骨细胞诱导组(B组)在破骨细胞分化生成及骨吸收功能上优于其他两组;而其他两组相比较,小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7)诱导组(C组)破骨细胞分化生成方面优于小鼠骨髓单核细胞诱导组(A组),骨吸收功能比较结果则相反。分析其原因笔者认为小鼠骨髓细胞+成骨细胞诱导组在破骨细胞培养阶段,由于成骨细胞分泌的大量M-CSF、RANKL等诱导因子促进了破骨细胞分化生成及功能活化;加之PGE<sub>2</sub>和VitD<sub>3</sub>在调节细胞分化和增殖方面起到重要作用,可以间接或直接的促进破骨细胞前体增殖,以及后期的分化,从而在诱导破骨细胞生成方面起重要的作用。两者的加入也促进了成骨细胞M-CSF、RANKL的大量分泌,并促使信号分子NFATc1、c-Fos表达的增强。笔者推测:A组及C组由于加入的外源性诱导因子试剂(M-CSF、RANKL),在细胞微环境中作用于细胞的诱导因子浓度可能小于B组,造成其下游相关信号分子及基因(c-Fos、NFATc1等)的表达减弱,导致其破骨细胞生成及分化较B组差。

本实验的研究结果提供出最优的破骨细胞培养体系,为破骨细胞相关领域的药物研究如双膦酸盐、辛伐他丁等药物对破骨细胞的影响提供了良好的细胞培养基础。

#### [参考文献]

- [1] Teitelbaum SL. RANKing c-Jun in osteoclast development [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(4):463-465
- [2] Yavropoulou MP, Yovos JG. Osteoclastogenesis-current knowledge and future perspectives [J]. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2008, 8(3):204-216
- [3] Asagiri M, Sato K, Usami T, et al. Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis [J]. *Exp Med*, 2005, 202(9):1261-1269
- [4] Al-Dujaili SA, Lau E, Al-Dujaili H, et al. Apoptotic osteocytes regulate osteoclast precursor recruitment and differentiation *in vitro* [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(9):2412-2423
- [5] Yamanaka Y, Abu-Amer W, Foglia D, et al. NFATc2 is an essential mediator of orthopedic particle-induced osteoclastogenesis [J]. *J Orthop Res*, 2008, 26(12):1577-1584
- [6] Lietman SA, Yin LH, Levine MA. SH3BP2 is an activator of NFAT activity and osteoclastogenesis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 371(4):644-648
- [7] Huang H, Ryu J, Ha J, et al. Osteoclast differentiation requires TAK1 and MKK6 for NFATc1 induction and NF-κB transactivation by RANKL [J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(11):1879-1891

- [8] Kwak HB, Kim JY, Kim KJ, et al. Risedronate directly inhibits osteoclast differentiation and inflammatory bone loss [J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(7): 119-1198
- [9] Ken T, Julia TO, Cheryl LJ. Clinical significance of interleukin (IL)-6 in cancer metastasis to bone; potential of anti-IL-6 therapies [J]. Cancer Manag Res, 2011, 3: 177-189
- [10] Matsuo K, Galson DL, Zhao C, et al. Nuclear factor of activated T cells (NFAT) rescues osteoclastogenesis in precursors lacking c-Fos [J]. J Biol Chem, 2004, 279 (25): 26475-26480

[收稿日期] 2012-11-04

## 本刊来稿题名和作者署名的注意事项

### 1. 题名

- (1) 题名应以简明、确切的词语反映文章中最重要特点内容, 要符合编制题录、索引和检索的有关原则, 并有助于选定关键词。
- (2) 中文题名一般不超过 20 个字, 必要时可加副题名。
- (3) 英文题名应与中文题名含义一致。
- (4) 题名应避免使用非公用的缩写词、字符、代号, 尽量不出现数学式或化学式。

### 2. 作者署名和工作单位

- (1) 文章都应有作者署名, 这是文责自负和拥有著作权的标志;
- (2) 作者姓名署于题名下方;
- (3) 英文摘要中附与中文同样的作者姓名与排列顺序, 写法为: 姓前名后, 姓全部大写, 名的首字母大写, 其余字母小写, 名间加连字符, 如 ZHOU Ping, SHI Hong-lei;
- (4) 作者单位需注明全称 (标注到二级或三级单位, 如“南京医科大学第一附属医院心内科”, “南京医科大学公共卫生学院流行病与统计学系”)、所在城市及邮政编码;
- (5) 对于有基金课题资助的论文需在课题负责人的名字后加上标“\*”, 并在论文首页下补充基金的名称、编号, 以及课题负责人的 E-mail。
- (6) 本刊对于没有课题资助的文章一律不标注通讯作者。

(本刊编辑: 接雅俐)