

细胞共培养技术在骨组织生物学中的应用

谢丽 孟芮 商澎*

(西北工业大学生命学院, 西北工业大学特殊环境生物物理学研究所, 空间生物实验模拟技术国防重点学科实验室, 西安 710072)

摘要 骨组织不同细胞相互交织构成了复杂的网络结构, 通过旁分泌和间隙连接途径相互传递信号, 调节了个体发育的骨重塑和成体的骨重建过程。细胞共培养技术是研究细胞间相互作用的重要手段, 目前主要有接触式和非接触式两种。就骨组织而言, 由于骨细胞(osteocyte)在力学感知及调节骨重塑/重建平衡中的中心枢纽作用, 建立适宜于骨细胞与骨组织其他细胞间的共培养技术, 对于骨组织基础生物学的研究具有重要意义。该文就当前应用于骨组织生物学中的细胞共培养技术进行综述。

关键词 细胞共培养; 骨组织; 骨细胞

Application of Cells Co-culture Technique in Bone Tissue Biology

Xie Li, Meng Rui, Shang Peng*

(Key Laboratory for Space Bioscience and Biotechnology, Institute of Special Environmental Biophysics, School of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China)

Abstract Different bone cells constitutes a complex network structure, which transmit signals each other via paracrine and gap junction channels and adjust bone modeling and remodeling. Cells co-culture technique is the key method to investigate cell/cell interactions *in vitro*. Currently, this technique has two types: the contact co-culture and non-contact co-culture. For the bone tissue, since the importance of osteocyte in mechanical sensing and in regulation of bone modeling and remodeling, it is important for the research of bone biology to establish the suitable co-culture technique between osteocyte and other bone cells. This article is aimed at reviewing the development of cells co-culture technique in the bone tissue biology.

Key words cells co-culture; bone tissue; osteocyte

1 引言

机体骨组织细胞主要包括骨髓间充质干细胞、成骨细胞、骨细胞、破骨细胞和骨衬细胞等。这些细胞相互交织构成了复杂的网络结构, 通过旁分泌和间隙连接途径相互传递信号, 调节了个体发育的骨重塑和成体的骨重建过程。其中, 骨细胞作为骨

组织力学感受器和力-化学信号的传递者, 在骨重塑和/或骨重建过程中起着中心枢纽的作用^[1-3]。因此, 以骨细胞为中心, 研究骨组织细胞间的相互作用是阐明骨组织力-化学信号机制的关键。细胞共培养技术为体外研究骨组织细胞间的相互作用提供重要的技术平台。

收稿日期: 2012-09-05 接受日期: 2012-10-29

国家自然科学基金(批准号: 30970689)和西北工业大学基础研究基金(批准号: JC20110233)资助的课题

*通讯作者。Tel: 029-88490391, E-mail: shangpeng@nwpu.edu.cn

Received: September 5, 2012 Accepted: October 29, 2012

This work was supported by the National Natural Science of China (Grant No.30970689) and the Basic Research Fundation of Northwestern Polytechnical University (Grant No.JC20110233)

*Corresponding author. Tel: +86-29-88490391, E-mail: shangpeng@nwpu.edu.cn

2 细胞共培养技术的研究进展

2.1 细胞共培养技术的发展

细胞共培养技术是在细胞培养技术的基础上发展出来的,是在体外将两种或两种以上的细胞放在同一种培养环境中孵育,相对真实地模拟细胞在体内的生长环境和细胞的性状。与体内研究相比,共培养系统体积小、参数可控,检测结果更直观,更有利于研究细胞与细胞之间以及细胞与外环境之间的相互作用。

最早报导的细胞共培养技术是在生殖医学领域,1965年Cole和Paul^[4]将小鼠胚胎与辐照过的HeLa细胞共培养,大大提高了胚胎在体外的发育能力。之后,1975年英国免疫学家C. Milstein和G. Kohler将小鼠淋巴细胞(脾细胞)与小鼠肿瘤细胞(骨髓瘤细胞)杂交融合成单克隆细胞而得到单克隆抗体,由此他们获得1984年诺贝尔生理学医学奖。随着人们对机体组织细胞认识的深入,在体外单独培养一种细胞来研究其功能已不能满足人们对细胞真我的认识,在体外进行细胞实验的目的就是希望看到细胞体外研究的结果是在体内功能的真实映照,因此,只有当体外的培养环境与体内更接近时,细胞所展现出的功能才会更真实。

目前,细胞共培养技术已深入到多个学科,如生殖医学、药理学、毒理学、骨组织生物学、神经生物学、再生医学^[5]、细胞生物学等,应用于诱导细胞分化(诱导一种细胞向另一种细胞分化或细胞自身的分化)、调控细胞增殖和细胞活性、维持细胞功能等研究方向。

2.2 细胞共培养技术的分类

根据细胞类型和取材部位的不同以及研究目的不同,在实验中所采用的细胞共培养技术主要有两类。

一类是接触式共培养,即在同一个培养环境下共同孵育两种或两种以上的细胞,细胞与细胞之间建立直接的物理连接。目前,接触式共培养主要有两种形式:(1)三维共培养(即立体共培养),多见于组织工程的研究,主要利用生物材料制备的三维支架结构,将不同细胞接种到三维支架材料中,使细胞在三维培养环境下生长。(2)二维共培养:指细胞在二维平面上生长,实现细胞共培养。主要采用相邻共培养和混合共培养。前者多见于细胞信号转导、细胞功能性间隙连接等方面的研究,是指两种细胞通

过细胞突起建立直接的物理连接,但细胞胞体没有接触。文献中多采用插入式培养皿(Transwell小室)来进行此类共培养实验,即分别在小室膜的两面接种不同类型的细胞,细胞突起可以通过膜上的小孔相连。后者是将两种或两种以上的细胞直接混合接种在一起,细胞之间彼此相连。

另一类是非接触式共培养,即在同一个培养环境下孵育两种或两种以上的细胞,细胞与细胞之间彼此不接触没有建立物理连接。目前主要有两种形式:(1)远距共培养,共培养的两种细胞或细胞群之间存在一定的微小距离,但不接触。可以将两种细胞分别接种在不同的基底上,再放置到同一种培养基中进行共培养,也可以利用Transwell小室进行共培养,即在小室内接种一种细胞,在培养皿底接种另一种细胞,Transwell小室膜可以将两种或两群细胞隔离使其不接触,膜上的微孔可以让培养液互通而不影响细胞间的物质交换。(2)条件培养基共培养,将预先收集的A类细胞的培养液上清作为条件培养基来培养B类细胞,观察B类细胞在A类细胞的培养液中的生长情况以及功能变化。

2.3 微纳米尺度共培养

微流体系统在分子和细胞生物学研究中有着很大的应用前景,其小型化、集成化和自动化的优势可以对神经元单细胞周围的微环境进行精确控制^[6]。神经细胞的形态特点主要是轴突长、树突多而短且有多个分支,Peyrin等^[7]根据这一特点设计出一个轴突二极管单细胞共培养模型,将神经细胞接种在微管的一侧,单个细胞的轴突可沿着微管的方向伸出,从而达到单细胞共培养条件下的微环境控制来研究突触传导的功能。为单细胞共培养技术开辟了一个新的方向。

3 骨组织生物学的进展

3.1 骨组织工程的研究

随着医学的发展,用人工合成的组织器官替换功能缺失的人体器官植入体内已是较为成熟的技术,但仍不可避免地存在着人体各种免疫排斥反应,因此,植入材料与组织细胞的相容性成为材料科学与再生医学领域中首先要解决的问题之一。18世纪,英国人John Barton在人体髋部制造了一个假关节。19世纪40年代,法国人Judet发明了一种新的股骨头假体置换术,将一段金属柄植入到截断的股骨内。

但以上病人术后不久大部分出现假体严重磨损、机体免疫排斥等现象,终以失败告结。直到上个世纪中期,生物相容性材料聚甲基丙烯酸酯、维塔利姆合金(Vitallium)、钛等的出现,骨假体的使用寿命才得以延长^[8]。在口腔医学领域,牙槽骨植骨术利用引导骨组织再生技术为临床种植牙的修复提供了有利条件^[9]。

3.2 骨基础生物学研究

在骨组织内的细胞中成骨细胞和破骨细胞位于骨表面分别行使着骨形成和骨吸收的功能,骨细胞和骨衬细胞长期驻于骨基质内,通过骨小管系统彼此相连。骨作为有活性的组织器官,破骨细胞骨吸收后成骨细胞形成新骨并沉积,这是一个动态平衡的过程。当这种平衡被打破,直接表现出骨量、骨密度的变化。比如骨质疏松,就是以骨量减少、骨的微观结构退化为特征的一种疾病,后果是增加了骨的脆性和骨折的几率。在正常生理状态下,人体骨量高峰出现在30岁左右,随后逐渐呈下降趋势,绝经后的女性由于雌激素水平的下降导致这种下降趋势尤为明显^[10]。由于RANK的配体RANKL具有参与破骨细胞分化促进骨吸收的作用,在临床上使用对RANKL有特异性亲和力的人IgG₂单克隆抗体(Denosumab),可针对性治疗绝经后妇女的骨质疏松预防骨折的发生^[11]。引起骨丢失的原因除了生理、病理性的骨质疏松外还有废用性骨质疏松,比如长期卧床的病人和长期载人飞行的航天员等,主要原因就是骨细胞受到的机械应力减小或不受力而引起的。有研究表明机械振动可对抗骨量丢失^[12],主动加强锻炼并辅助以一定的针对性设备^[13]可改善或延缓废用性骨量丢失的发生。

由于骨细胞与其他组织细胞相比有其独特性,在成熟骨组织中其数量最多寿命最长,形态学表现为星状并有多个树枝状突起,对力学刺激最为敏感^[14-15],但体内骨细胞位于骨基质陷窝内不易检测。Kamioka等^[16]用免疫荧光染色法标记鸡胚颅盖骨,在激光共聚焦显微镜下成功地观察到了骨细胞在原位的三维图像。为直观了解骨细胞在骨组织内的分布和生长情况奠定了检测基础。随后他们又发现成骨细胞的肌动蛋白微丝在机械负荷作用下大量重新分布,而骨细胞无变化^[17],这种稳定的结构对维持机械负荷作用下的骨组织细胞网络具有重要作用。

骨组织细胞感受到的机械负荷来自多个方面,

不仅有外在地球引力的作用,同时也受到内在流体剪切力的作用。在体外单独培养细胞时Cheng等^[18]发现,骨样细胞MLO-Y4在16 dyn/cm²的流体剪切力下作用2 h,细胞突起增长并且有新的突起生成、间隙连接通道开放以及Cx43蛋白重新分配,相同的实验对于成骨样细胞2T3则没有发现类似效应。如果在共培养的环境下对细胞施加一定的力学刺激,则可能实现更真实的模拟。2004年Takai等^[19]取3~4月龄小牛掌骨骨骺部位的骨小梁芯部制成直径5 mm、高4 mm的圆柱形小块,建立了三维骨小梁外植体模型,用以研究骨细胞与成骨细胞之间的相互作用。在整个培养过程中有部分的原代骨细胞保持了活性,将原代成骨细胞接种在这个模型上,同时每天施加1 h频率为0.33 Hz峰值强度为3 MPa的三角波,使其处于动态净水压的环境中,发现骨细胞的存活率有了显著地提高,而在没有接种成骨细胞的模型上,骨细胞的成活能力呈现出明显下降的趋势,提示骨细胞在传导力的信号以及调节成骨细胞功能方面都起到了关键的作用。而Taylor等^[20]建立了另一种骨细胞-成骨细胞三维共培养模型,该模型在Transwell小室的基础上添加了一个旋转盘装置用来产生流体剪切力。分别将小鼠长骨骨样细胞MLO-Y4和人胚胎成骨细胞hFOB1.19接种在Transwell小室膜的顶面和底面进行共培养,利用旋转盘在顶面施加4.4 dyn/cm²的流体剪切力而底面细胞不受影响,结果显示,当骨细胞在流体剪切力的作用下与成骨细胞呈接触式共培养时,成骨细胞的碱性磷酸酶活性显著增高。提示骨细胞在受到机械刺激的情况下可能会释放出某些因子并以细胞之间功能性的间隙连接的形式来调节成骨细胞的分化功能。2009年Chan等^[21]用3月龄的牛跗骨跗骨关节建立了一种三维骨小梁外植体模型,在该模型上骨小梁外植体能够使骨细胞保持活性,实验结果提示骨小梁支架动态的形变可以显著增加骨细胞释放PEG₂,促进骨形成,提高骨外植体的弹性模量。将在相同部位取材的原代成骨细胞接种在原位骨小梁外植体支架上进行共培养,检测到成骨细胞与骨细胞之间建立了功能性间隙连接通道。Adachi等^[22]选取鸡胚颅盖骨骨细胞与相邻骨表面细胞进行共培养,来研究受刺激细胞传递钙离子信号给相邻细胞的比例以及传播方向,他们发现,无论哪类细胞受到刺激,传递到骨表面细胞的钙离子信号都显著增强。这意味着钙离子信号在骨组织细

胞间的传播主要依靠接收信号细胞的类型而不是的发射信号细胞的类型。同时, 骨细胞与骨表面细胞(主要是成骨细胞)之间钙离子信号的传播趋势也呈现不对称性, 当受到机械负荷刺激时, 钙离子信号主要由骨细胞传递给骨表面细胞。

骨骼在生物有机体中主要起着保护内脏组织、提供肌肉的附着点和运动系统的刚性支架的作用, 为肌肉活动和身体运动提供力学支撑。从现有的研究来看, 对骨力学感知及响应机制研究主要集中在废用性骨丢失的机制研究。虽然在老年人骨质疏松、长期卧床(缺乏力学负荷)病人的骨质疏松、空间失重性骨丢失的机制研究方面已取得较大进展, 但目前仍不清楚。

存在问题: 骨力学感知及响应机制的研究, 大多集中在单种细胞的研究上, 而体内骨组织是一个复杂的多细胞网络结构, 因此需要将骨组织不同细胞联系起来, 研究不同细胞间的相互作用, 尤其是骨细胞对其他细胞的调控作用。目前, 共培养技术是制约骨组织细胞间相互作用研究的重要方面。

4 细胞共培养技术在骨组织生物学中的应用进展

在传统的体外细胞培养过程中, 一般是在静态的环境下采用平面式单层培养系统孵育细胞并检测其功能调节情况, 而骨组织细胞在体内呈现为立体的分布, 骨细胞位于骨基质陷窝内与骨表面的成骨细胞和破骨细胞相互协调作用, 使机体骨量处于动态平衡的状态。因此在骨组织生物学研究中, 选用细胞共培养技术成为必要的手段。目前, 用于骨组织生物学中的共培养技术主要包括接触式和非接触式两种。

4.1 接触式共培养技术在骨生物学研究中的应用

在三维立体式共培养实验中, 研究者建立适合于骨细胞生长的支架, 来满足细胞在体外三维空间的条件下生长。Chan等^[21]从牛跟腱取骨块, 经多步胰酶消化, 建立原位骨组织共培养模型。2006年, Kurata等^[23]开发了一种三维嵌入式培养模型, 将小鼠骨样细胞MLO-Y4嵌入在I型骨胶原凝胶中与接种在凝胶表面的骨髓细胞进行共培养(图1)。骨细胞突起可以在凝胶中伸展, 细胞与细胞之间建立直接的物理连接, 更好地模拟了骨细胞在骨组织内的生长环境。他们将一根直径0.44 mm的不锈钢线插

入凝胶来回往复造成骨细胞的划伤, 发现损伤的骨细胞释放的可溶性因子能够局部地诱导和激活初级破骨细胞形成。说明了在骨重建过程中受损的骨细胞与再吸收阶段的启动关系密切。2009年, Deborah Mason等在第31届美国骨矿研究学会(ASBMR)年会上报道了用I型胶原凝胶三维共培养模型培养骨细胞与成骨细胞, 说明了骨形成的调节机制。

然而与体内相比, 体外培养时有活性的骨细胞数量较少且生存时间缩短, 方法受到局限。二维共培养选用的细胞大多是已建系的细胞, 如小鼠长骨骨样细胞MLO-Y4、小鼠前成骨样细胞2T3、小鼠成骨细胞MC3T3-E1、大鼠成骨细胞ROS17/2.8与UMR106.1、人胚胎成骨细胞hFOB1.19、人前破骨细胞FLG29.1和小鼠单核巨噬细胞RAW264.7等, 从培养方法和检测方法上弥补了这一缺陷。Yellowley等^[24]采用混合共培养的方式培养小鼠骨样细胞MLO-Y4和小鼠成骨细胞MC3T3-E1, 发现MLO-Y4与MC3T3-E1可以建立功能性的间隙连接通道, 当给予MLO-Y4细胞轻微的压力使之发生形变后可以诱发胞内短暂的钙离子浓度升高, 并快速地传递给相邻的MC3T3-E1细胞。Vatsa等^[25]对单个骨细胞施加机械刺激, 发现骨细胞受刺激后在胞内可以迅速的产生NO而且在其周围的骨细胞也检测到大量的NO。Bonewald等^[26]将MLO-Y4与小鼠脾细胞或骨髓细胞混合共培养后发现, 骨细胞通过物理连接可促进破骨细胞形成, 而骨细胞的条件培养基对破骨细胞形成没有作用。Yaccoby等^[27]将多发性骨髓瘤细胞和破骨细胞接种在Insert插入式共培养小室(Transwell小室)膜的一侧, 将成骨细胞接种到膜的另一侧, 实现二维平面三种细胞接触式共培养。Zhou等^[28]将成骨细胞与转基因鼠的间充质祖细胞分别接种在Transwell小室膜两面共培养。Taylor等^[20]等也利用Transwell小室, 将MLO-Y4和hFOB1.19分别接种在小室PET膜的两侧, 实现了骨细胞与成骨细胞二维接触式共培养。2007年, Wang等^[29]在组织培养孔中放置了一种宽5 mm、可透水的4%琼脂糖凝胶隔离成骨细胞和成纤维细胞, 将这两种细胞接种在凝胶的两侧, 贴壁生长第7天时取出隔板暴露出凝胶部分, 继续培养7天, 观察到位于凝胶两侧的成骨细胞和成纤维细胞均向中间地带(凝胶部分)迁移, 并成功地观察到三个区域, 依次为成纤维细胞生长区域、成纤维细胞与成骨细胞混合生长区域以及成

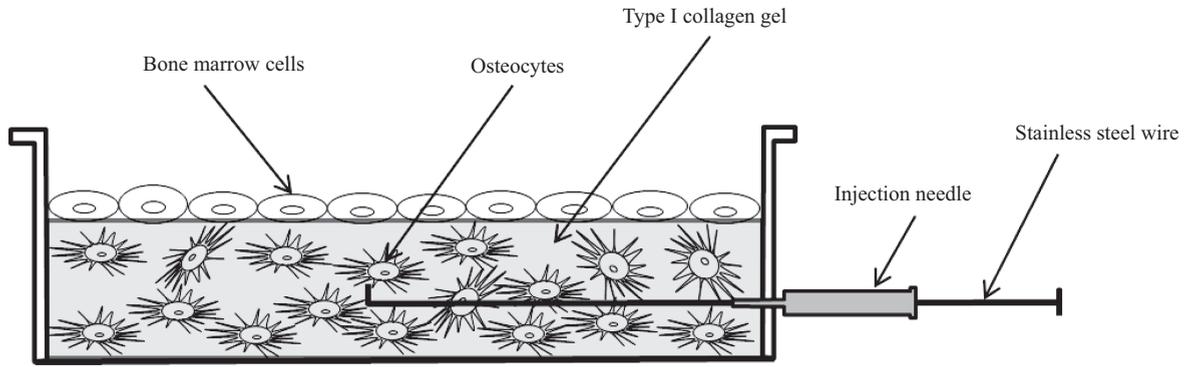


图1 对嵌入凝胶内培养的骨细胞造成局部机械划伤装置(根据参考文献[23]修改)

Fig.1 A scratching device was developed for applying local mechanical scratching to the gel-embedded osteocyte culture(modified from reference [23])

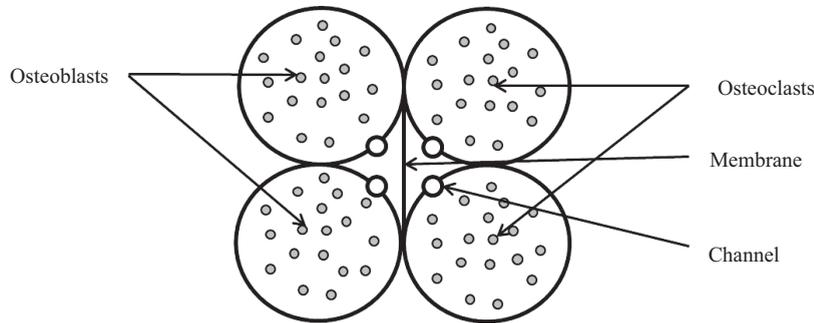


图2 成骨细胞与破骨细胞二维共培养示意图(根据参考文献[34]修改)

Fig.2 2D osteoblast/osteoclast co-culture system(modified from reference [34])

骨细胞生长区域,为后续的细胞共培养实验做了良好的铺垫。Boggs等^[30]为了研究骨细胞与神经细胞之间的相互作用开发了一种将小鼠长骨骨样细胞MLO-Y4与小鼠初级背根神经节细胞DRG共培养的平面式双蛋白微图形模型。利用细胞对不同基质蛋白质的偏好筛选出适合MLO-Y4细胞黏附的PlnDIV和适合DRG细胞黏附的Ln,通过PDMS微接触打印技术将PlnDIV和Ln在基底上图形化,使两种细胞按照设计好的图形黏附生长。实现了两种不同的细胞在二维平面上以单细胞的形式共培养。

4.2 非接触式共培养技术在骨组织生物学研究中的应用

远距共培养是非接触式共培养的方法之一,通常以对照组的角色与相邻共培养平行进行。在Taylor等^[20]的研究中,MLO-Y4与hFOB远距共培养时,对MLO-Y4细胞施加流体剪切力没有影响到hFOB细胞的碱性磷酸酶活性,而当两种细胞相邻共培养时hFOB细胞的碱性磷酸酶活性有显著的增高。

Masuyama等^[31]将软骨细胞接种在Transwell小室内,然后在培养皿底接种成骨细胞,实现了两种细胞的远距共培养。条件培养基共培养与远距共培养相比体现的是间接效应,在骨组织生物学的研究中主要见于以下细胞的共培养。

4.2.1 骨细胞与成骨细胞共培养 孟芮等^[32-33]分别收集三维回转48, 72 h后的小鼠骨样细胞MLO-Y4培养液上清作为条件培养基培养小鼠成骨样细胞MC3T3-E1,发现该条件培养基促进了成骨细胞增殖,抑制了成骨相关基因ALP、Runx2、OPN、OC的表达。

4.2.2 成骨细胞与破骨细胞共培养 杨德洪等^[34]建立了一种平面式成骨细胞与破骨细胞体外共培养体系,两种细胞不接触但培养液互通。该体系将24孔或96孔细胞培养板进行改装(图2),在距培养孔底部2 mm的地方打上直径为4 mm的小孔,使相邻的4孔相通,中间加一层0.45 μm的隔膜,膜与培养板接触处用3%的琼脂糖凝胶密封,防止左右两室的细胞混

杂。通过在该共培养体系中将原代成骨细胞与原代破骨细胞共培养后发现二者的功能相互促进。武密山等^[35]应用这种共培养体系观察到补肾方抗骨松丹杞颗粒含药血清能够抑制大鼠破骨细胞骨吸收活性。Watkins等^[36]将从cKO(*Gjal*基因敲除, *Cx43*^{fl/fl})或WTfl(*Gjal*基因敲除的野生型对照, *Cx43*^{wild/fl})小鼠骨髓中分离出来的成骨细胞和破骨细胞前体细胞放置到24孔板中用添加了维生素D和地塞米松的条件培养基共培养7天, 检测到TRAP阳性率增加以及多核破骨细胞的形成。从目前的研究中可知, 成骨细胞能够刺激破骨细胞的形成, Rauch等^[37]通过共培养成骨细胞与破骨细胞前体细胞, 发现在低剂量糖皮质激素环境下成骨细胞内的糖皮质激素受体有助于破骨细胞生成。

4.2.3 骨细胞与骨髓间充质干细胞共培养 Birmingham等^[38]分别用预处理的骨细胞MLO-Y4条件培养基和预处理的成骨细胞MC3T3-E1条件培养基来培养骨髓间充质干细胞(MSCs), 发现骨细胞和成骨细胞产生的生化信号可以刺激MSCs向成骨细胞分化。

4.2.4 骨细胞与破骨细胞共培养 鲁秀敏等^[39]将骨髓单核细胞接种在玻片或骨片上培养24 h, 然后移入已提前24 h接种了成骨细胞的培养皿中进行共培养, 来研究成骨细胞与破骨细胞之间的相互作用, 结果提示, 在该系统中成骨细胞能够诱导破骨细胞加强噬骨的能力。You等^[40]研究表明, 将骨细胞MLO-Y4与破骨细胞前体细胞RAW264.7混合共培养, 骨细胞可促进破骨细胞的形成、增强骨吸收活性, 当给骨细胞施加震荡性流体后, 则降低了破骨细胞的形成和骨吸收活性, 且降低了RANKL/OPG比率。骨细胞遭受震荡性流体刺激后的条件培养基可抑制破骨细胞的形成和RANKL/OPG比率。

4.3 不同细胞共培养技术在骨组织生物学研究中的优缺点

在接触式细胞共培养技术中, 三维立体式共培养主要是以不同生物材料支架为基础, 模拟骨组织细胞在体内的生长环境为其提供立体的生存空间, 其优点在于支架的形貌、硬度以及细胞外基质的分布都与体内环境更接近, 也更有利于施加不同强度的力学刺激来观察骨组织细胞的感应, 但该方法的检测手段比较局限, 仅能做细胞形态学的观察和胞外信号的检测, 而无法将共培养的细胞完全分离, 因此, 对于细胞间的相互调控作用机制不能做进一步

深入研究。相邻共培养和混合共培养较三维立体式共培养而言, 优点在于细胞数量多、细胞间容易建立间隙连接通道、便于后期检测, 另外相邻共培养可以分别收集共培养的不同细胞, 但采用该方法共培养时, 由于Transwell小室膜很薄, 厚度通常在10 μm左右, 双面接种的骨组织细胞在光学显微镜下不易区分。而混合共培养方法虽然可以在光学显微镜下直接观察到共培养的细胞形态, 但在后期检测时无法将不同的细胞分离。

在非接触式共培养技术中, 远距共培养与条件培养基共培养都是通过旁分泌途径研究细胞间的调控作用。远距共培养主要是研究两种细胞之间的相互调节作用, 而条件培养基共培养更容易解释一种细胞对另一种细胞的调节作用。

综上所述, 当将体外细胞共培养技术应用于骨组织生物学研究时, 无论是采用接触式还是非接触式共培养技术都只能部分反应骨组织细胞的功能。因此, 需要从研究目的出发来选择适合的细胞共培养方式。

5 小结与展望

两种或两种以上细胞共培养技术是在传统单种细胞培养技术上的发展。由于细胞在体内处于一个繁密的网络系统之中, 同种细胞或不同细胞间通过自分泌、旁分泌和间隙连接的方式相互传递信号, 执行各种功能。因此, 单独研究一种细胞的功能远不能解决大多生物学问题。随着上个世纪60年代细胞共培养技术开始在生殖医学领域出现, 利用共培养技术研究细胞间相互调控作用已经成为一大新的研究领域。目前, 在体外应用共培养技术围绕着诱导细胞分化、调节细胞增殖、促进细胞发育等功能开展了一系列的研究。主要集中在神经干细胞、骨髓间充质干细胞和骨组织细胞三个方面, 本文主要侧重于阐述共培养技术在骨组织细胞网络中的应用进展。

骨是体内最具动力和代谢活力的组织之一, 它独特的结构和力学性能是骨骼系统保护内脏器官、提供运动系统的刚性支架、完成运动的基础。骨细胞在体内被包埋在矿化的骨基质中, 其众多的突起通过骨小管与效应细胞形成间隙连接, 执行力学感知和细胞间信号传递功能。骨细胞的这种特殊形态和定位决定了其重要的功能, 同时也给骨细胞的研

究以及骨细胞与骨组织其它细胞间的相互调控作用研究带来了挑战。虽然目前共培养技术发展迅速, 并已在骨基础生物学研究中应用, 但这些模型远不能满足骨细胞特殊形态结构的要求, 因此, 当前急需建立一种适宜于骨组织, 尤其是骨细胞与骨组织其他细胞的共培养模型。

随着细胞共培养技术在骨组织生物学研究中的发展, 从平面式静态培养向着三维立体动态培养发展是骨基础细胞生物学研究的一个方向。目前, 体外细胞共培养技术在骨细胞生物学中的研究还主要是针对两种细胞的共培养(骨-成骨细胞、骨-破骨细胞、成骨-破骨细胞、骨-骨髓间充质干细胞等), 而在体内这些细胞处于一个相互交织的网络系统之中, 发展多种细胞的共培养技术成为目标之一。另外, 从单细胞水平上研究细胞间的相互作用, 可以更好地理解细胞的某种特殊功能, 因此, 开发单细胞共培养技术也成为研究单细胞功能的主要技术方向之一。我们相信, 随着材料学和细胞生物学技术的发展, 细胞共培养技术将在骨组织生物学研究中取得更大的突破。

参考文献 (References)

- Bonewald LF. Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bonekey Osteovision* 2006; 3(10): 7-15.
- Gusmão CV, Belangero WD. How do bone cells sense mechanical loading. *Rev Bras Ortop* 2009; 44(4): 299-305.
- 蹇爱荣, 胡丽芳, 狄升蒙, 高翔, 孟芮, 商澎. 骨细胞在力学信号感受过程中的作用. *中华航空航天医学杂志*(Qian Aorong, Hu Lifang, Di Shengmeng, Gao Xiang, Meng Rui, Shang Peng. Roles of osteocytes in mechanosensation. *Chin J Aerospace Med*) 2010; 21(2): 149-53.
- Cole RJ, Paul J. Properties of cultured preimplantation mouse and rabbit embryos, and cell strains derived from them. *Ciba Foundation Symposium-Preimplantation Stages of Pregnancy* 1965; 82-112.
- James Kirkpatrick C, Fuchs S, Iris Hermanns M, Peters K, Unger RE. Cell culture models of higher complexity in tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials* 2007; 28(34): 5193-8.
- Wang J, Ren L, Li L, Liu W, Zhou J, Yu W, *et al.* Microfluidics: A new cosset for neurobiology. *Lab Chip* 2009; 9(5): 644-52.
- Peyrin JM, Deleglise B, Saias L, Vignes M, Gougis P, Magnifico S, *et al.* Axon diodes for the reconstruction of oriented neuronal networks in microfluidic chambers. *Lab Chip* 2011; 21(11): 3663-73.
- Mow VC, Huiskes R, 主编. 骨科生物力学暨力学生物学, 第3版. 汤亭亭, 裴国献, 李旭, 白波, 主译. 山东: 山东科学技术出版社(Mow VC, Huiskes R. *Basic Orthopaedic Biomechanics and Mechano-Biology*, 3rd ed. Tang Tingting, Pei Guoxian, Li Xu, Bai Bo, Translate. Shandong: Shangdong Scientific and Technical Publishers), 2009, 12-6.
- 蒋斯, 韩泽民. 引导骨组织再生技术在牙槽骨植骨中的应用现状. *武警医学院学报*(Jiang Si, Han Zeming. Current situation on the clinical application of alveolar augmentation combine with guided bone regeneration. *Acta Academiae Medicinae CPAF*) 2011; 20(8): 686-8.
- Riggs BL, Melton LJ 3rd. Evidence for two distinct syndromes of involutional osteoporosis. *Am J Med* 1983; 75(6): 899-901.
- Dempster DW, Laming CL, Kostenuik PJ, Grauer A. Role of RANK ligand and denosumab, a targeted RANK ligand inhibitor, in bone health and osteoporosis: A review of preclinical and clinical data. *Clin Ther* 2012; 34(3): 521-36.
- 丁冲, 杨宛园, 杨鹏飞, 商澎. 关于机械振动对抗骨量丢失的研究进展. *中华物理医学与康复杂志*(Ding Chong, Yang Xi-anyuan, Yang Pengfei, Shang Peng. Advance in countermeasure against bone loss of vibration. *Chin J Phys Med Rehabil*) 2010; 32(10): 795-7.
- 丁冲, 杨鹏飞, 商澎. 用于预防和治疗骨丢失的机械振动装置. *北京生物医学工程*(Ding Chong, Yang Pengfei, Shang Peng. A mechanical vibration device for preventing and treating bone loss. *Beijing Biomedical Engineering*) 2009; 28(2): 165-9.
- Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 2011; 26(2): 229-38.
- Peadar MJ, Suswillo R, Skerry TM, Vedi S, Lanyon LE. Increased 3H-uridine levels in osteocytes following a single short period of dynamic bone loading *in vivo*. *Calcif Tissue Int* 1988; 43(2): 92-6.
- Kamioka H, Honjo T, Takano-Yamamoto T. A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy. *Bone* 2001; 28(2): 145-9.
- Kamioka H, Sugawara Y, Honjo T, Yamashiro T, Takano-Yamamoto T. Terminal differentiation of osteoblasts to osteocytes is accompanied by dramatic changes in the distribution of actin-binding proteins. *J Bone Miner Res* 2004; 19(3): 471-8.
- Cheng B, Zhao S, Luo J, Sprague E, Bonewald LF, Jiang JX. Expression of functional gap junctions and regulation by fluid flow in osteocyte-like MLO-Y4 cells. *J Bone Miner Res* 2001; 16(2): 249-59.
- Takai E, Mauck RL, Hung CT, Guo XE. Osteocyte viability and regulation of osteoblast function in a 3D trabecular bone explant under dynamic hydrostatic pressure. *J Bone Miner Res* 2004; 19(9): 1403-10.
- Taylor AF, Saunders MM, Shingle DL, Cimbala JM, Zhou Z, Donahue HJ. Mechanically stimulated osteocytes regulate osteoblastic activity via gap junctions. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292(2): 545-52.
- Chan ME, Lu XL, Huo B, Baik AD, Chiang V, Guldberg RE, *et al.* A trabecular bone explant model of osteocyte-osteoblast coculture for bone mechanobiology. *Cell Mol Bioeng* 2009; 2(3): 405-15.
- Adachi T, Aonuma Y, Taira K, Hojo M, Kamioka H. Asymmetric intercellular communication between bone cells: propagation of the calcium signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 389(3): 495-500.
- Kurata K, Heino TJ, Higaki H, Väänänen HK. Bone marrow cell differentiation induced by mechanically damaged osteocytes in 3D gel-embedded culture. *J Bone Miner Res* 2006; 21(4): 616-

- 25.
- 24 Yellowley CE, Li Z, Zhou Z, Jacobs CR, Donahue HJ. Functional gap junctions between osteocytic and osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 2000; 15(2): 209-17.
- 25 Vatsa A, Smit TH, Klein-Nulend J. Extracellular NO signalling from a mechanically stimulated osteocyte. *J Biomech* 2007; 40 Suppl 1: S89-95.
- 26 Zhao S, Zhang YK, Harris S, Ahuja SS, Bonewald LF. MLO-Y4 osteocyte-like cells support osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res* 2002; 17(11): 2068-79.
- 27 Yaccoby S, Wezeman MJ, Zangari M, Walker R, Cottler-Fox M, Gaddy D, *et al.* Inhibitory effects of osteoblasts and increased bone formation on myeloma in novel culture systems and a myelomatous mouse model. *Haematologica* 2006; 91(2): 192-9.
- 28 Zhou H, Mak W, Zheng Y, Dunstan CR, Seibel MJ. Osteoblasts directly control lineage commitment of mesenchymal progenitor cells through Wnt signaling. *J Biol Chem* 2008; 283(4): 1936-45.
- 29 Wang IE, Shan J, Choi R, Oh S, Kepler CK, Chen FH, *et al.* Role of osteoblast-fibroblast interactions in the formation of the ligament-to-bone interface. *J Orthop Res* 2007; 25(12): 1609-20.
- 30 Boggs ME, Thompson WR, Farach-Carson MC, Duncan RL, Beebe TP. Co-culture of osteocytes and neurons on a unique patterned surface. *Biointerphases* 2011; 6(4): 200-9.
- 31 Masuyama R, Stockmans I, Torrekens S, van Looveren R, Maes C, Carmeliet P, *et al.* Vitamin D receptor in chondrocytes promotes osteoclastogenesis and regulates FGF23 production in osteoblasts. *J Clin Invest* 2006; 116(12): 3150-9.
- 32 孟 芮, 罗明志, 王 亮, 高 翔, 狄升蒙, 商 澎. 三维回转骨细胞条件培养基对成骨细胞功能的调节作用. *中国生物化学与分子生物学报*(Meng Rui, Luo Mingzhi, Wang Liang, Gao Xi-ang, Di Shengmeng, Shang Peng. Regulating role of conditioned medium of osteocytes subjected to 3-D rotation on functions of osteoblasts. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*) 2010; 26(2): 95-102.
- 33 孟 芮, 续惠云, 王 哲, 张 维, 商 澎. 模拟失重骨细胞条件培养基对成骨细胞活性的影响. *航天医学与医学工程*(Meng Rui, Xu Huiyun, Wang Zhe, Zhang Wei, Shang Peng. Effects of conditioned medium of osteocytes subjected to simulated weightlessness on activity of osteoblasts. *Space Medicine & Medical Engineering*) 2009; 22(4): 247-51.
- 34 杨德洪, 金大地, 陈建庭, 武大林, 景宗森. 共育体系中成骨细胞和破骨细胞生物学特性观察. *中华骨科杂志*(Yang Dehong, Jin Dadi, Chen Jianting, Wu Dalin, Jing Zongsen. The biological characteristics of osteoblasts and osteoclasts in co-culture system. *Chin J Orthop*) 2001; 21(11): 676-80.
- 35 武密山, 赵素芝, 李 恩, 白 霞. 抗骨松丹杞颗粒含药血清对成骨-破骨细胞共培养体系中破骨细胞功能的影响. *中国病理生理杂志*(Wu Mishan, Zhao Suzhi, Li En, Bai Xia. Effect of Kang Gu Song Dan Qi instant granules contained serum on the activity of osteoclasts in osteoblasts and osteoclasts co-culture system. *Chinese Journal of Pathophysiology*) 2010; 26(8): 1635-6, 1639.
- 36 Watkins M, Grimston SK, Norris JY, Guillotin B, Shaw A, Beniash E, *et al.* Osteoblast Connexin43 Modulates Skeletal Architecture by Regulating Both Arms of Bone Remodeling. *Mol Biol Cell* 2011; 22(8): 1240-51.
- 37 Rauch A, Seitz S, Baschant U, Schilling AF, Illing A, Stride B, *et al.* Glucocorticoids suppress bone formation by attenuating osteoblast differentiation via the monomeric glucocorticoid receptor. *Cell Metab* 2010; 11(6): 517-31.
- 38 Birmingham E, Niebur GL, McHugh PE, Shaw G, Barry FP, McNamara LM. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *Eur Cell Mater* 2012; 23: 13-27.
- 39 鲁秀敏, 陈 林, 苏 楠, 李福兵, 赵 玲. 小鼠成骨细胞和破骨细胞共培养模型的建立. *中国骨质疏松杂志*(Lu Xiumin, Chen Lin, Su Nan, Li Fubin, Zhao Ling. Establishment of co-culture model of mouse osteoblasts and osteoclasts. *Chin J Osteoporos*) 2008; 14(3): 159-63.
- 40 You L, Temiyasathit S, Lee P, Kim CH, Tummala P, Yao W, *et al.* Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading. *Bone* 2008; 42(1): 172-9.