

从人骨巨细胞瘤组织中纯化破骨细胞的简单方法

王运林* 刘晓晴 夏 秦 官玉红

(华中科技大学同济医学院附属同济医院老年科, 武汉 430030)

摘要 利用破骨细胞贴壁快以及耐胰蛋白酶地特性, 采用 0.25% 胰蛋白酶和 0.2% I 型胶原酶来分离纯化骨巨细胞中的破骨细胞, 即得到破骨细胞, 并进行细胞学和分子生物学鉴定, 包括抗酒石酸酸性磷酸酶染色和 HE 染色, 并采用 RT-PCR 反应方法检测降钙素受体、组织蛋白酶 K 和破骨细胞分化因子受体的表达。该方法所得细胞纯度可达 79.7%, 具有破骨细胞表型特征。可用于生化和分子生物学研究, 是进行骨细胞学研究的破骨细胞来源。

关键词 破骨细胞; 抗酒石酸酸性磷酸酶; 降钙素受体; 组织蛋白酶 K

破骨细胞是由造血干细胞分化而成^[1,2], 在骨髓中, 单核细胞融合成多核巨形的破骨细胞, 无增殖能力, 且数量较少。成熟破骨细胞的生成有赖于两种细胞因子: 单核-巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)和破骨细胞分化因子(receptor activator of necrosis factor κ B ligand, RANKL)。成熟破骨细胞表型包括表达抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)^[3], 碳酸酐酶 II (carbonic anhydrase II, CAII)^[4], 玻璃黏连蛋白受体(vitronectin receptor, VNR)^[5], 降钙素受体 (calcitonin receptor, CTR)^[6]和非受体型酪氨酸激酶 c-Src^[7]。传统上破骨细胞分化研究受技术条件限制, 产量低, 活性差, 缺乏成熟的破骨细胞系^[8-10], 然而, 近二十年发现的方法已克服了这些问题, 首先是能够从不同的种属纯化成熟的破骨细胞, 包括鸟^[11]、鼠^[12]、兔^[13]。但除了兔以外, 大部分其他种属的破骨细胞纯化均存在各种缺陷: 产量低、混有其他细胞、活性差等。另外的方法是从前体细胞诱导成具有破骨细胞表型的多核细胞, 也称为破骨样细胞, 这些方法应用于猫、狗、鼠、鸟、猪及人的骨髓细胞。共同培养系统的发展明显优于以往的骨髓单种细胞培养。迄今为止, 动物中破骨细胞最好的来源是幼兔, 所得破骨细胞活性很好, 高表达破骨细胞的特征性基因^[13]。

本文力求建立一种新的破骨细胞纯化及培养方法, 以骨巨细胞瘤组织为标本, 纯化出成熟的破骨细胞, 并进行特征性基因的表达。

1 材料与方法

1.1 仪器和器材

Nikon300 型自动摄像倒置显微镜(Nikon 公司); 紫外/可见分光光度计、Gene Amp2400 PCR 扩增仪(Perkin Elmer 公司); 细胞培养瓶及培养板(Nunc 公司)。

1.2 主要试剂

无酚红 α -MEM 培养基、I 型胶原酶均购自 Sigma 公司; 胰蛋白酶-EDTA、焦碳酸二乙酯(DEPC)、Trizol、胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司; 逆转录试剂盒购自 Promega 公司; Taq 酶购自上海生工生物工程有限公司; 引物合成于上海博亚生物工程有限公司; GeneRuler™ 100DNA Ladder 购自上海生工生物工程有限公司。血细胞 ACP 染色测定试剂盒购自上海太阳生物技术公司。萘酚 AS-BI 磷酸钠购自 Sigma 公司。

1.3 骨巨细胞瘤组织中破骨细胞的纯化

取瘤组织置于含的 α -MEM 培养液(含 10%FBS、50 μ g/ml 抗坏血酸、1 000 U/ml 青霉素、1 000 μ g/ml 链霉素)的 50 ml 离心管中, 在超净台上, 取出瘤组织置于培养皿中, 离心管中的细胞沉渣加入含 10%FBS 的 α -MEM, 转移至 25 cm² 培养瓶。将瘤组织剪成 2 mm³ 大小的碎粒, 加入 0.2%I 型胶原酶, 于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中消化 20 min, 1 $\times$ PBS 清洗, 200 g 离心 5 min 后弃上清液, 如此反复清

收稿日期: 2005-06-13 接受日期: 2005-09-12

湖北省自然科学基金(No.2004ABA251), 华中科技大学基金(No.200301)资助项目

* 通讯作者。Tel: 027-83663504, Fax: 027-83662640, E-mail: 01dw@21cn.com

洗3次,加入含10%FBS的 α -MEM,转移至25 cm²培养瓶。上述两组培养瓶于37℃、5% CO₂培养箱中培养1~2 h后,弃培养液,1×PBS清洗3次,加入0.25%胰蛋白酶-EDTA于培养箱中消化5 min,1×PBS清洗10次,残余细胞用0.2%I型胶原酶于培养箱中消化5 min,1×PBS清洗,200 g离心5 min后弃上清液,如此反复清洗3次,加入含10%FBS的 α -MEM,即得到纯化的破骨细胞。将纯化的破骨细胞转移至24孔培养板(预置有0.9 cm×0.9 cm盖玻片)和25 cm²培养瓶中,于培养箱中培养。用于细胞形态和功能鉴定。

1.4 破骨细胞功能鉴定

(1)抗酒石酸酸性磷酸酶染色(TRAP染色):参考文献[14]方法。(2)HE染色。(3)检测特征性基因表达:加入Trizol并吹打裂解细胞,抽提总RNA,取2 μ g总RNA合成cDNA,取1 μ l cDNA进行RT-PCR扩增CTR、破骨细胞分化因子受体(receptor activator of necrosis factor κ B, RANK)和组织蛋白酶K(cathepsin K, CK)的表达,反应总体积20 μ l,引物序列及反应条件见表1。扩增产物在1.2%琼脂糖凝胶中电泳,溴化乙啶染色显影并照相。

2 结果

2.1 破骨细胞形态

光镜可见盖玻片上附着一些圆而大的多核细胞,细胞贴壁后早期成圆形或椭圆形,无伪足伸展。培养1~2 h后细胞形态逐渐发生变化,伸出伪足,具有皱褶缘,表现为多形性:圆形、椭圆形、扇形、多边形、漏斗形及其他不规则形态,随着培养时间延长细胞形态变化越大,细胞表面不平整(图1a,图1b),符合破骨细胞的形态特征。

2.2 TRAP染色

破骨细胞经TRAP染色后,显示大量空泡和伪足,胞浆成棕黄色,胞核成棕褐色(图2)。在低倍显微镜下任选10个视野,计算破骨细胞纯度,纯

度为(79.7±5.24)%,说明我们分离的破骨细胞纯度较高,为进一步研究打下了基础。

2.3 HE染色

胞核为褐色、多个,胞浆为红褐色(图3)

2.4 RT-PCR反应

测定CTR、RANK、CK基因表达(图4)

3 讨论

自Chamber等^[12]从新生动物体内成功地分离出破骨细胞后,MacDonald等^[15]用人的骨髓在骨趋化因子(主要是1,25-(OH)₂D₃)作用下,培养出破骨细胞样细胞。Tezuka等^[13]从新生兔子骨中分离的破骨细胞是成熟破骨细胞,细胞数量足够用作生化研究,但每只兔子所含破骨细胞相对较少。对于更进一步的研究,如需要细胞数量较多,则要很多兔子才能满足要求。

我们通过体外培养,观察到破骨细胞无增殖能力,破骨细胞具有较强耐受胰蛋白酶的特性,具有皱褶缘结构,细胞形态为多核、多空泡、多伪足、多形态等破骨细胞的特征。鉴定破骨细胞的重要指标是TRAP染色,由于破骨细胞的胞浆中富含TRAP,多核巨噬细胞却没有,故前者染色阳性。同时该细胞表达CTR、RANK、CK,因此完全具备破骨细胞的特征,这一点也得到Lau等^[16]的证实。从骨巨细胞瘤组织中分离的破骨细胞数量较多,可开展破骨细胞的分子生物学研究,克服了从动物分离破骨细胞较少的缺点。

破骨细胞的纯化一直是研究破骨细胞方法上的一个瓶颈,有关破骨细胞是否表达雌激素受体长期以来争论不休,其技术上的难点就是破骨细胞的纯度较低^[17,18]。而检测组织蛋白酶K、B、L、S^[19]以及CTR^[17]在破骨细胞上是否表达,其前提就是纯化破骨细胞,因而提高破骨细胞的纯度非常重要。

无论取材于动物或者人体,目前国内外所采用的破骨细胞纯化大致有以下三种方法:(1)单纯机械

表1 CTR、RANK、CK基因引物序列及RT-PCR反应条件

扩增基因	引物序列 (5'→3')	退火温度 (℃)	Mg ²⁺ 浓度 (mmol/L)	循环次数 (次)	产物长度 (bp)
CTR	有义: GCAATGCTTTCACTCCTGAGAAAC 反义: CAGTAAACACAGCCACGACAATGAG	58	1.8	30	363
RANK	有义: CCTACGCACAAGGCGAAGATGC 反义: CTGAGACCACGATGATGTCGCC	62	1.5	30	702
CK	有义: CTCAAGGTTCTGCTGCTA 反义: GACAGGAGTAACATATCC	53	1.3	30	381

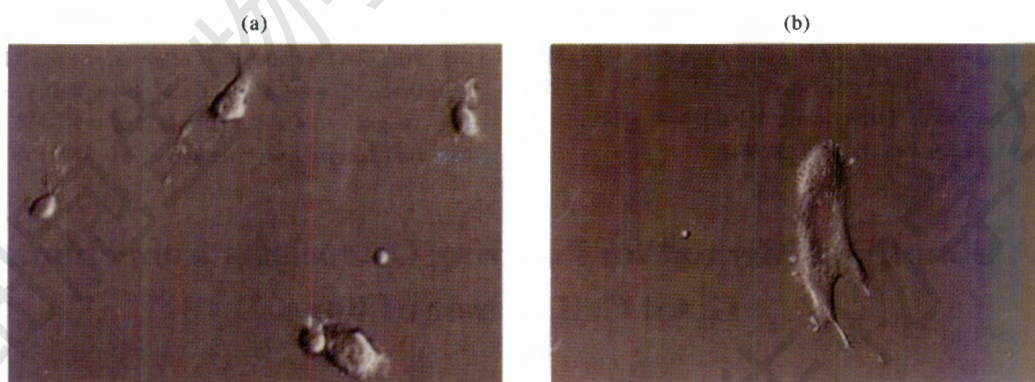


图1 破骨细胞形态

a: 培养 2 h (200 ×); b: 培养 6 h (400 ×)。

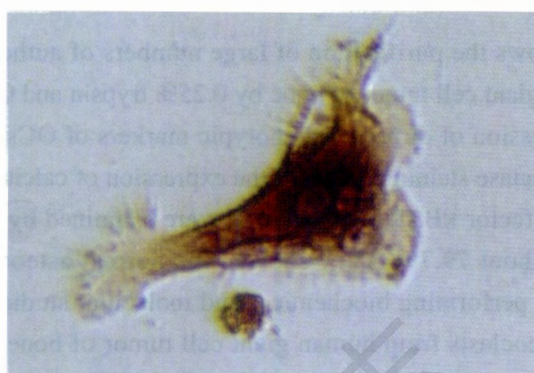


图2 破骨细胞 TRAP 染色(400 ×)

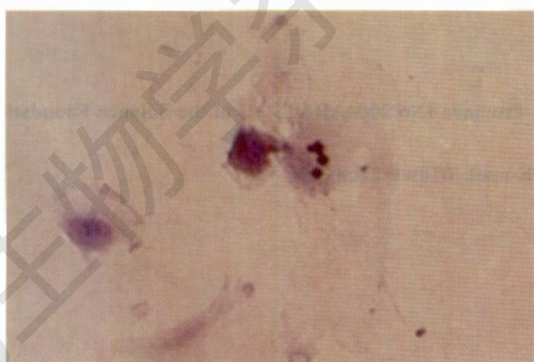


图3 破骨细胞 HE 染色(400 ×)

微分离技术^[20], 所用微吸管直径为 100 μm , 在显微镜下操作, 所要求的技术含量高, 设备条件要求也高, 且费时, 但细胞纯度不高。(2)胰酶胶原酶消化法^[21], 该方法利用破骨细胞与 I 型胶原酶高亲和力, 简单易行, 但细胞纯度不高, 约 50%~70%。(3)单克隆抗体结合免疫磁珠法, 所得细胞纯度很高, 达 90% 以上, 但该方法价格昂贵, 设备和条件要求高, 应用范围受限^[18]。我们利用破骨细胞体积较大(20~100 μm)及耐胰蛋白酶特性, 采用胰蛋

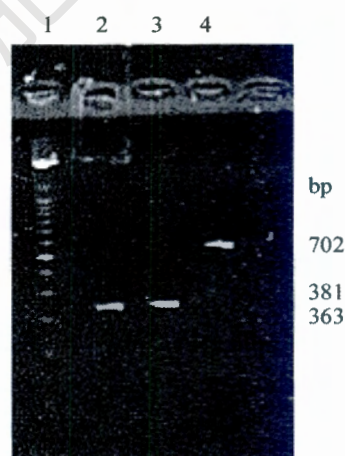


图4 RT-PCR 反应

1: marker; 2: CTR; 3: CK; 4: RANK。

白酶-胶原酶消化所得破骨细胞纯度达 80%, 该方法既经济又实用。

综上所述, 我们建立了一种比较简单有效的人破骨细胞分离方法。其特点是所得破骨细胞数量较多, 而且来源于人体, 具有破骨细胞典型特征, 方法简单易行, 是研究破骨细胞较好的材料来源。

参考文献 (References)

- [1] Burger EH *et al. J Exp Med*, 1982, **156**: 1604
- [2] Scheven BA *et al. Nature*, 1986, **321**: 79
- [3] Minkin C. *Calcif Tissue Int*, 1982, **34**: 285
- [4] Gay CV *et al. Science*, 1974, **183**: 432
- [5] Davies J *et al. J Cell Biol*, 1989, **109**: 1817
- [6] Nicholson GC *et al. J Clin Invest*, 1986, **78**: 355
- [7] Horne WC *et al. J Cell Biol*, 1992, **119**: 1003
- [8] Hattersley G *et al. J Cell Physiol*, 1989, **140**: 478
- [9] Boyce BF *et al. Endocrinology*, 1995, **136**: 5751
- [10] Shin JH *et al. Endocrinology*, 1995 **136**: 4285
- [11] Oursler MJ *et al. J Bone Miner Res*, 1991, **6**: 375
- [12] Chambers TJ *et al. J Pathol*, 1982, **136**: 27

- [13] Tezuka K *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 1992, **186**: 911
[14] Van de wijngaert FP *et al. J Histochem Cytochem*, 1986, **34**: 1317
[15] MacDonald BR *et al. Endocrinology*, 1987, **120**: 2326
[16] Lau YS *et al. Hum Pathol*, 2005, **36**: 945
[17] Collier FM *et al. Endocrinology*, 1998, **139**: 1258
[18] Pederson L *et al. J Bone Miner Res*, 1997, **12**: 742
[19] Drake FH *et al. J Biol Chem*, 1996, **271**: 12511
[20] Tong HS *et al. J Bone Miner Res*, 1994, **9**: 577
[21] Jimi E *et al. Endocrinology*, 1996, **137**: 2187

A Simplified Method for Purifying Osteoclasts from Human Giant Cell Tumor of Bone

Yun-Lin Wang*, Xiao-Qin Liu, Qin Xia, Yu-Hong Guan

(Department of Gerontism, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract We have developed a new method that allows the purification of large numbers of authentic osteoclasts (OCs). The OCs were isolated from tissue of human giant cell tumor of bone by 0.25% trypsin and 0.2% type I collagenase. We characterized OCs in terms of the expression of different phenotypic markers of OCs. the phenotypic markers of OC include Tartrate-resistant acid phosphatase staining (TRAP), the expression of calcitonin receptor (CTR), cathepsin K and receptor activator of necrosis factor κ B (RANK) mRNA were examined by RT-PCR. The OCs cell purified by above method, the purity is about 79.7%. They showed the normal osteoclast phenotypes markers of OC. The method provided a system for performing biochemical and molecular studies of OCs. The study indicated that the method of purifying the osteoclasts from human giant cell tumor of bone cell could be used for research of bone metabolism.

Key words osteoclasts; tartrate-resistant acid phosphatase; calcitonin receptor; receptor activator of necrosis factor κ B; cathepsin K

Received: July 13, 2005 Accepted: September 12, 2005

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hubei Province (No.2004ABA251) and the Science Foundation of Huazhong University of Science and Technology (No.200301)

*Corresponding author. Tel: 86-27-83663504, Fax: 86-27-83662640, E-mail: 01dw@21cn.com